

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

Otimização da análise de imagem para estimar o tamanho do repasto de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Phlebotominae) e avaliação do Parafilm[®] tratado em alimentador artificial

LAURA AQUINO GENEROSO

Belo Horizonte - MG

Agosto de 2022

LAURA AQUINO GENEROSO

Otimização da análise de imagem para estimar o tamanho do repasto de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Phlebotominae) e avaliação do Parafilm[®] tratado em alimentador artificial

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientadora: Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa

Co-orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira

Belo Horizonte

Agosto de 2022

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, sob orientação da Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa e co-orientação do Dr. Marcos Horácio Pereira.

Colaboradores:

César Nonato

Dr. Leonardo Barbosa Koerich

Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna

Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Msc. Lidiane Medeiros da Costa

Msc. Natália Alvim Araújo Saab

043

Generoso, Laura Aquino.

Otimização da análise de imagem para estimar o tamanho do repasto de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Phlebotominae) e avaliação do Parafilm® tratado em alimentador artificial [manuscrito] / Laura Aquino Generoso. – 2022.

99 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa. Co-orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Dípteros. 3. Psychodidae. 4. Leishmaniose. 5. Alimentação Artificial. I. Pessoa, Grasielle Caldas D'Ávila. II. Pereira, Marcos Horácio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COLEGIADO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE DE IMAGEM PARA ESTIMAR O TAMANHO DO
REPASTO DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (DIPTERA; PHLEBOTOMINAE) E AVALIAÇÃO
DO PARAFILM® TRATADO EM ALIMENTADOR ARTIFICIAL.**

ALUNA: LAURA AQUINO GENEROSO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENTOMOLOGIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **dezenove de agosto de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Denise Barguil Nepomuceno

Universidade Federal da Bahia, UFBA

Kelsilândia Aguiar Martins

Royal Veterinary College-University of London, UK

Marcos Horácio Pereira - Coorientador

UFMG

Grasielle Caldas D'Avila Pessoa - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 19 de agosto de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Grasielle Caldas D Avila Pessoa**,
Professora do



Magistério Superior, em 22/08/2022, às 13:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **DENISE BARGUIL NEPOMUCENO, Usuária Externa**, em 22/08/2022, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Horacio Pereira, Membro**, em 22/08/2022, às 20:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1580101** e o código CRC **E284ED9B**.

A minha avó Ana Miquelão Aquino

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Rosana Miquelão, por todo apoio e incentivo. Desde a entrada no curso de Ciência Biológicas, ao apoio fundamental para a realização do meu TCC, que me permitiu chegar até aqui e realizar o sonho do mestrado. Por sempre acreditar em mim e no meu potencial. Agradeço também a minha avó, Ana Miquelão, que por muitas vezes também desempenhou o papel de mãe e sempre esteve ao meu lado (saudades eternas!).

Ao Luís, pela cumplicidade e parceria, pelas palavras de carinho em todos os momentos de dificuldade, por me incentivar e encorajar. Por estar ao meu lado sempre e me apoiar em tudo.

As irmãs que fiz durante a caminhada do mestrado Anna Pio, Ana Cristina e Giovana Rotondo, pelas trocas de experiências e pelos momentos de descontração que foram essenciais, levarei vocês para a vida toda.

Aos sauropsidas, meus irmãos biólogos, que também estiveram presentes durante toda essa caminhada.

A minha orientadora, professora Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa, pela oportunidade e orientação. Além disso, pela disponibilidade em me ajudar durante a realização dos experimentos.

Ao meu coorientador, Marcos Horácio Pereira, pelo auxílio fundamental nos experimentos e análise dos resultados. Agradeço pela disponibilidade, ideias, persistência e atenção. Levarei seus ensinamentos para toda a vida.

A toda a equipe LFIH agradeço pela convivência, colaboração e aprendizados durante todo esse tempo. Aos professores, Nelder, Maurício e Léo, pelas discussões e troca de experiências. Ao César Nonato, por toda contribuição, parceria, ensinamentos, disposição e conversas. À Karoline de Menezes que nos apresentou a tecnologia do plasmagel e nos ensinou a prepará-lo. À Natália Saab e Lidiane Medeiros, pelos ensinamentos e participação em todos os experimentos de bancada.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, em especial à Sumara e Sibebe, pela disponibilidade, cuidado, atenção e auxílio. Aos professores do Departamento de Parasitologia, por todos os ensinamentos que foram fundamentais a minha formação profissional.

À Universidade Federal de Minas Gerais e às agências de fomento, CNPq, CAPES, INCT-Entomologia, que possibilitaram a realização deste trabalho.

RESUMO

Os flebotomíneos constituem um importante grupo de dípteros hematófagos, pois atuam como vetores dos agentes causadores da leishmaniose em humanos, animais domésticos e silvestres. O estabelecimento de colônias produtivas de flebotomíneos, é de particular importância para sanar as muitas lacunas da sua biologia e da interação parasito-vetor. Um ponto importante para a manutenção dos flebotomíneos é a oferta do repasto sanguíneo às fêmeas, seja *in vivo*, a partir do uso de animais de laboratório, ou *in vitro*, utilizando alimentador artificial. Mesmo na alimentação artificial é frequente a necessidade do uso tecidos ou órgãos de animais como membrana de alimentação, atuando como a interface inseto-sangue. Para flebotomíneos, a membrana mais comumente utilizada é a pele de pintinho (*Gallus gallus domesticus*). Contudo, a redução do uso de cobaias no processo de alimentação dos insetos em laboratório, é desejável. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso da membrana Parafilm® tratada com Plasma gel na alimentação artificial de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) e estabelecer um protocolo de processamento de imagens para estimar o tamanho do repasto sanguíneo dos flebotomíneos (*in vitro* e *in vivo*). Foram utilizadas, durante os ensaios de alimentação, fêmeas de flebotomíneos com 3 à 6 dias de idade pós emergência para o estágio adulto. Para alimentação *in vitro*, foi utilizado o aparelho Hemotek (Hemotek Ltd.). Foram utilizadas três membranas: i) Membrana de pele de pinto (controle positivo - C+); ii) Parafilm® M sem tratamento (controle negativo - C⁻) e iii) Parafilm® M tratado com Plasma gel (Plasma gel – PG). Os testes de alimentação *in vivo* foram realizados com *hamsters* anestesiados (*hamster* – H). A alimentação dos insetos foi avaliada pela porcentagem de fêmeas que se alimentaram e pelo volume do repasto sanguíneo estimado, utilizando a dosagem de hemoglobina (teste bioquímico) e/ou a área do abdômen (análise de imagem). Nos testes de alimentação foram avaliadas um total de 1889 fêmeas, sendo que destas, 969 se alimentaram (57,03%). A análise conjunta de todos os grupos experimentais (C-, C+, PG e H) mostrou que a idade das fêmeas influenciou na performance alimentar dos insetos. Quanto maior o período pós emergência, maior foi a porcentagem de fêmeas alimentadas e menor o tamanho do repasto. Porém quando se comparou os resultados alcançados com fêmeas das 4 idades avaliadas (3 a 6 dias) entre os grupos experimentais, o tamanho do repasto sanguíneo foi semelhante, mas a proporção de insetos alimentados foi diferente entre eles, sendo que a ordem da porcentagem de insetos alimentados foi H (83,0%) > C+ (69,1%) > PG (51,4%) > C- (12,9%). A comparação entre a dosagem de hemoglobina e a análise de imagem baseou-se nos resultados obtidos a partir da análise de 1053 fêmeas. Dentre eles, as estimativas da largura (corte= 0,59 mm) e da

área abdominal (corte= 0,73 mm²) foram as que apresentaram o melhor desempenho quando comparados com a dosagem de hemoglobina, apresentando uma convergência na capacidade de caracterizar as fêmeas em alimentadas e não alimentadas de 94,0 e 93,5%, respectivamente. Quando a largura e a área abdominal foram analisadas em função da variação do volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina, ambas apresentaram uma alta correlação, com $R^2 = 0,84$ e $0,85$, respectivamente.

Palavras chave: Diptera, Psychodidae, Phlebotominae, *Lutzomyia longipalpis*, Leishmanioses, Alimentação artificial, Hemotek, Parafilm[®] M, Plasma gel.

ABSTRACT

Sandflies constitute an essential group of blood-sucking dipterans, as they act as vectors of the causative agents of leishmaniasis in humans and domestic and wild animals. Establishing productive sandfly colonies is vital to understanding the many gaps in their biology and parasite-vector interaction. An essential point for the maintenance of sandflies is the offer of blood meal to females, either *in vivo*, using laboratory animals, or *in vitro*, using an artificial feeder. In artificial feeding, it is necessary to use animal tissues or organs as feeding membrane that acts at the insect-blood interface. The most used membrane for sandflies is chick skin (*Gallus gallus domesticus*). However, reducing the use of animals in the process of feeding insects in laboratory is desirable. In this sense, the objective of the present work was to evaluate the use of Parafilm® M membrane treated with Plasma gel in the artificial feeding of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and to establish an image processing protocol to estimate the size of the blood meal of sandflies. During the feeding trials, female sandflies aged 3-6 days after the emergence of adult insects were used. For *in vitro* feeding, used Hemotek device. Three membranes were used: i) chick skin membrane (positive control - C+); ii) Parafilm® M without treatment (negative control - C-); and iii) Parafilm® M treated with Plasma gel (Plasma gel - PG). *In vivo* feeding tests were performed with anesthetized hamsters (hamster – H). The sand flies feeding was evaluated by the percentage of females fed and the blood meal size, using the dosage of hemoglobin (biochemical test) and/or the abdomen area (image analysis). In the feeding tests, 1889 females were evaluated, of which 969 were fed (57.03%). The analysis of all experimental groups (C-, C+, PG, and H) showed that the age of the females influenced the feeding performance. The longer the post-emergence period, the greater the proportion of females fed and the smaller the blood meal size. However, the blood meal size was similar when comparing the results achieved with females of the four ages (3 to 6 days) between the experimental groups. But the proportion of insects fed was different between them, the order of the percentage of insects fed obtained was H (83.0%) > C+ (69.1%) > PG (51.4%) > C- (12.9%). The comparison between hemoglobin dosage and image analysis was based on the results obtained from the analysis of 1053 females. Among them, the estimative of width (cut = 0.59 mm) and abdominal area (cut = 0.73 mm²) were the ones that presented the best performance when compared to the hemoglobin dosage, showing convergence in the ability to characterize the females in fed and unfed of 94.0 and 93.5%, respectively. When the width and the abdominal area were analyzed as a function of blood variation volume estimated by the hemoglobin dosage, both showed a high correlation, with R² = 0.84 and 0.85, respectively.

Key words: Diptera, Psychodidae, Phebotominae, *Lutzomyia longipalpis*, Leishmaniasis, Artificial feeding, Hemotek, Parafilm[®] M, Plasma gel.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** (A) Amastigotas de *Leishmania tropica* de uma biópsia cutânea. Nesta figura, um macrófago intacto está praticamente preenchido com amastigotas indicadas pelas setas, as quais têm um núcleo e cinetoplasto claramente visíveis (B), promastigotas de *Leishmania* sp. Desenhos esquemáticos das formas de *Leishmania* sp., amastigota (C) e promastigota (D). Foto: (A) CDC, 2017; (B) Rocha, 2009; (C, D) Luís Rey, 2008. **3**
- Figura 2:** Ciclo de vida holometábolo dos flebotomíneos (A), ilustrando as fases de ovo (B), larva (C), e pupa (D). Foto: (A) adaptado de Lawyer et al. 2000, (B, C, D) Wladimir Fasito do Vale. **6**
- Figura 3:** Adultos de *Lutzomyia longipalpis*: macho (A) e fêmea (B). As setas pretas indicam a extremidade posterior do corpo bifurcada nos machos enquanto nas fêmeas é pontuda e ligeiramente arredondada. Foto: (A) José R. Botelho, (B) Luccas Malta **7**
- Figura 4:** Distribuição mundial de *Lutzomyia longipalpis*. As áreas em vermelho correspondem a locais onde o vetor está presente e atua ou é suspeito de atuar como vetor do parasito *Leishmania spp.* e as áreas em verde correspondem a locais onde o inseto não está presente ou não atua como vetor da leishmaniose. Fonte: WHO, 2019 **9**
- Figura 5:** Esquema da metodologia de Modi & Teshi (1983) com modificações utilizada na manutenção da colônia do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (ICB-UFMG). (1) Fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* realizando repasto sanguíneo em hamster macho anestesiado com Thiopentax. (2) Cerca de 5 dias após o repasto, quando as fêmeas já realizaram a digestão do sangue ingerido, elas são transferidas junto aos machos para potes plásticos de oviposição fechados com voil. Dentro dos potes é colocado uma sanfona de papel filtro para aumentar a área de oviposição das fêmeas. (3) Após a morte dos insetos, o voil é retirado e substituído por plástico filme. (3.1) Larvas L1 e L2 alimentadas com ração composta por mistura de fezes secas de coelho, ração para coelho e húmus. (3.2) Larvas L3 e L4 alimentadas com proteína de soja e Neston®. (4) Plástico filme substituído por tecido voil. (4.1) Pupação seguida da emergência dos insetos adultos. (5) Soltura dos insetos adultos em gaiolas de nylon. (6) As gaiolas são colocadas dentro de sacos plásticos junto com esponjas humedecidas, as esponjas mantem a umidade necessária para a sobrevivência dos insetos. Foto: (1) Natália Saab **11**
- Figura 6:** Sistema artificial de vidro utilizado para repasto sanguíneo de fêmeas de *Aedes aegypti* equipado com termocirculador (seta preta), com membrana acoplada a abertura inferior da estrutura de vidro do aparato (seta vermelha). Foto: Dias et al. 2020 **15**
- Figura 7:** (A) Aparato montado para alimentação artificial de *L. longipalpis* ajustado em cima do pote telado, onde os insetos são mantidos durante o repasto. (B) Detalhe do reservatório (c), do anel de vedação (seta vermelha) e do suporte termostatizado (t), onde o reservatório é acoplado, formando a unidade de alimentação. O aparelho permite a utilização em simultâneo de até cinco unidades de alimentação. O volume de sangue utilizado para uma refeição padrão de flebotomíneos é de 2ml. Foto: (A) Mauricio Sant'Anna (B) Manual do equipamento (Hemotek Ltd). **16**
- Figura 8:** (A) Plasma obtido após centrifugação do sangue; (B) Plasma gel formado após os ciclos de aquecimento apresentando o seu aspecto gelatinoso característico. **25**
- Figura 9:** (A) Membrana artificial (Parafilm® M) acoplada ao reservatório do Hemotek pelo anel de vedação logo após aplicação do plasma gel. (B) Membrana após secagem do plasma gel e com reservatório cheio de sangue. **26**

Figura 10: (A) Caixa de isopor fechada durante o teste de alimentação *in vitro* com as unidades de alimentação conectadas a unidade controladora do Hemotek. (B) Caixa de isopor destampada mostrando as unidades de alimentação sobre os potes contendo os insetos (seta preta) e o recipiente onde o *hamster* foi mantido durante o experimento (fonte de liberação de CO₂) (seta vermelha). 28

Figura 11: Disposição típica das amostras por linha (A-H) na placa de cultura confeccionada para a dosagem de hemoglobina visando estimar o volume de sangue ingerido pelas fêmeas após os testes de alimentação (*in vitro* e *in vivo*). A, B e C: Curvas padrão; D: Branco (B); E: *Hamster* (H); F: Controle positivo (C+); G: Plasma gel (PG); H: controle negativo (C-). 30

Figura 12: Imagens de grupos de flebotomíneos calibradas (mm) com auxílio do programa Fiji ImageJ. (A) grupo de fêmeas em jejum (B); (B) grupo de fêmeas após o teste de alimentação *in vitro* com membrana Parafilm[®] M tratada com plasma gel (PG). 31

Figura 13: Criação da máscara do contorno do abdômen das fêmeas de flebotomíneo. (A) Imagem colorida (RGB) de uma fêmea após o teste de alimentação (B) Região limítrofe entre o tórax e o abdômen demarcado em azul. (C) Imagem anterior convertida no seu componente azul em tom de cinza. (D) Imagem anterior convertida em preto e branco 8 bits. (E) Contorno do abdômen selecionado em amarelo (F) Máscara abdômen (M-AB) representada pela linha azul. Legenda: A seta indica a separação gerada entre o abdômen e o restante do corpo da fêmea de flebotomíneo. 32

Figura 14: Criação da máscara do contorno da cor vermelha corpo das fêmeas de flebotomíneo. (A) Imagem colorida (RGB) de uma fêmea após o teste de alimentação. (B) Imagem anterior convertida em CIELAB mostrando o seu componente “a” (verde-vermelho) (C) Imagem anterior convertida em preto e branco 8-bit mostrando a região preta selecionada em amarelo. (D) Máscara da região vermelha do corpo (MS) representada pela linha verde. 33

Figura 15: Imagem de quadro fêmeas de flebotomíneos após o teste da alimentação *in vivo* (grupo H). (A) As fêmeas 1 e 2 que estão nitidamente ingurgitadas, sendo que a 1 apresenta sangue em cobrindo praticamente toda a área do abdômen e em parte do tórax, enquanto a 2 o sangue ocupa apenas parte do abdômen, já as fêmeas 3 e 4, aparentemente não se alimentaram. (B) A mesma imagem anterior, mas com os traçados do contorno do abdômen (M-AB) em verde e do contorno da região vermelha (MS) no corpo do inseto em azul. 37

Figura 16: Comparação da forma do contorno irregular do abdômen de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após o teste de alimentação pelo traçado da M-AB (amarelo) com o traçado obtido após a aplicação o recurso *Fit Ellipse* (preto). 38

Figura 17: Estimativa do comprimento e a largura do abdômen das fêmeas de flebotomíneos gerado pelo recurso fit ellipse. (A) Imagem de uma fêmea ingurgitada. (B) A fêmea da imagem anterior com o traçado da M-AB em verde (C) O traçado da ellipse ajustada gerada pela aplicação do recurso fit ellipse na M-AB em branco, destacando diâmetro maior (*Major*) e diâmetro menor (*Minor*). Legenda: A seta preta indica o diâmetro maior e a seta vermelha indica o diâmetro menor. 39

Figura 18: Comparação da área (mm²), Comprimento (mm) e largura (mm) do abdômen de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em jejum [branco (n=97)], alimentadas [AL (n=969)] ou não alimentadas [NAL (n=730)] após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*). Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (Tukey, p<0,05). A separação dos 40

insetos NAL e AL foi realizada pela ausência ($MS=0$) ou presença ($MS>0 \text{ mm}^2$) de região/área vermelha detectável no corpo dos insetos.

Figura 19: Variação do comprimento e da largura (mm) em função da área do abdômen dos insetos Não Alimentados (n= 730) com os Alimentados (n=969) após contato com a fonte de sangue. Enquanto o comprimento apresenta menor correlação ($R^2= 0,51$), a largura nitidamente apresenta uma alta correlação com a área do abdômen ($R^2= 0,96$). 41

Figura 20: Equação de regressão linear da variação dos valores de absorbância (540 nm) antes da subtração do branco em função do volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina. Os dados são relativos a 607 fêmeas categorizadas como alimentadas pela dosagem de hemoglobina após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*). 44

Figura 21: Variação do tamanho corporal e dilatação do abdômen e coloração do tórax-abdômen das fêmeas de flebotomíneo observados antes e após os ensaios de alimentação. (A) Variação do tamanho corporal de fêmeas em jejum (B) Fêmeas completamente ingurgitadas com sangue, a fêmea da direita apresenta coloração vermelha na região torácica além da abdominal (C) Fêmeas completamente ingurgitadas com sangue de *hamster*, a fêmea da direita apresenta coloração vermelha (mais brilhante) na região torácica e abdominal (D) Fêmeas ingurgitadas com líquido de coloração clara (E) Fêmea ingurgitada com líquido de cor laranja (F) Fêmeas com abdômen dividido em coloração clara e vermelha. 44

Figura 22: Equações de regressão linear das variações de parâmetros provenientes do processamento de imagens utilizados para a avaliação do repasto sanguíneo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em função do volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina. (A) Área do abdômen (M-AB) e da elipse ajustada (*fit ellipse*). (B) Comprimento e largura do abdômen. (C) Área vermelha (MS). (D) O volume do elipsoide gerado a partir da elipse ajustada ao contorno do abdômen dos insetos (M-AB). Os dados são relativos a 1053 fêmeas eutanasiadas após os testes de alimentação. O volume do elipsoide foi calculado pela fórmula $4/3\pi abc$ a partir dos dados do diâmetro maior (a) e do diâmetro menor (b) gerados pelo ajuste "*fit ellipse*" da M-AB e considerando que $b=c$ (esferoide em forma de charuto). Os dados foram ajustados por regressão linear simples (reta) e foi adicionado ao gráfico a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) de cada ajuste realizado. 46

Figura 23: Equação de regressão linear da variação do volume do elipsoide e da diferença Heme-Elipsoide em função do volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina. Os dados são relativos a 985 fêmeas eutanasiadas após os testes de alimentação. A diferença Heme-Elipsoide foi obtida pela subtração do valor volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina do valor do volume estimado da área do abdômen dos flebotomíneos (elipsoide). O volume do elipsoide foi calculado pela fórmula $4/3\pi abc$ a partir dos dados do diâmetro maior (a) e do diâmetro menor (b) gerados pelo ajuste "*fit ellipse*" da M-AB e considerando que $b=c$ (esferoide em forma de charuto). As 985 fêmeas incluídas nesta análise foram aquelas do universo de 1053 avaliadas tanto pelo parâmetro área do abdômen (M-AB) como pela dosagem de hemoglobina que apresentaram convergência entre estas duas metodologias na avaliação qualitativas dos insetos após alimentação (Tabela 1). Os dados foram ajustados por regressão linear simples (reta) e foi adicionado ao gráfico a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) de cada ajuste realizado. 47

Figura 24: Comparação do tamanho do repasto sanguíneo por idade pós emergência das fêmeas estimado: (A) Área do abdômen - A separação dos insetos NAL e AL foi realizada pela ausência ($MS=0$) ou presença ($MS>0 \text{ mm}^2$) de região/área vermelha detectável no corpo dos insetos; (B) Dosagem de hemoglobina – A separação dos insetos NAL e AL foi realizada 48

a partir do desconto do valor da absorvância dos insetos do grupo B. Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (Tukey, $p < 0,05$).

Figura 25: Comparação do tamanho do repasto sanguíneo entre os grupos experimentais [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H)], por idade pós emergência dos insetos adultos estimado: (A) Área do abdômen (mm^2) estimada por análise de imagem; (B) Volume de sangue (mm^3) estimado por dosagem de hemoglobina. Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (Tukey, $p < 0,05$). **50**

Figura 26: Comparação do tamanho do repasto sanguíneo dentro de cada grupo experimental [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H), por idade pós emergência dos insetos adultos estimado pela área do abdômen. Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (Tukey, $p < 0,05$). A separação dos insetos NAL e AL foi realizada pela ausência ($MS=0$) ou presença ($MS > 0 \text{ mm}^2$) de região/área vermelha detectável no corpo dos insetos. **51**

Figura 27: Porcentagem de fêmeas alimentadas por grupo experimental estimada a partir da área abdominal (mm^2) mensurada por análise de imagem [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H), por idade pós emergência dos insetos adultos. A linha tracejada representa a porcentagem média de todas as fêmeas alimentadas por idade pós emergência. **53**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Dados dos grupos experimentais e controles utilizados nos testes de alimentação (*in vitro* e *in vivo*) discriminando quais deles foram incluídos nas análises de imagens e/ou nos ensaios de dosagem de Hemoglobina. **38**
- Tabela 2:** Valores médios e do limiar da área (mm²), comprimento (mm) e largura (mm) do abdômen das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em jejum (B), alimentadas (AL) ou não alimentadas (NAL) após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*). A separação dos insetos NAL e AL foi realizada pela ausência (MS = 0) ou presença (M-S > 0 mm²) de região/área vermelha detectável no corpo dos insetos. **44**
- Tabela 3:** Comparação do número de insetos categorizados como alimentados (AL) ou não alimentados (NAL) entre as metodologias baseadas no processamento de imagens com baseada na dosagem de hemoglobina a partir de 1053 fêmeas avaliadas após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*). **45**
- Tabela 4:** Caracterização de fêmeas de flebotomíneos entre alimentadas (AL) e não alimentadas (NA) utilizando quatro critérios distintos [dosagem de hemoglobina, área vermelha (MS), área do abdômen (M-AB) e largura do abdômen]. As 17 fêmeas avaliadas foram aquelas que apresentaram o “fenótipo” abdômen claro (AP) após contato com a fonte de alimentação *in vitro*. **48**
- Tabela 5:** Resumo dos resultados dos grupos experimentais [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H)] obtidos através da análise do tamanho do repasto sanguíneo (AL) por idade pós emergência dos insetos adultos, estimado por análise de imagem [área do abdômen (mm²)] e dosagem de hemoglobina (mm³). **54**
- Tabela 6:** Resumo dos resultados dos grupos [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H)] da porcentagem de insetos alimentados (AL), por idade pós emergência dos insetos adultos, avaliado pela área do abdômen e pela dosagem de hemoglobina. **56**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Célsius
%	Por cento
AL	Alimentados
AB	Abdômen
C-	Controle negative
C+	Controle positive
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
H	<i>Hamster</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IntDen	“Densidade integrada” do inglês “Integrated Density”
L	Litros
LV	Leishmaniose visceral
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
M-AB	Máscara abdomen
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrados
mm ³	Milímetros cúbicos
n	Número amostral
nm	Nanômetros
MS	Máscara sangue
NA	Não alimentados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PG	Plasma gel
µl	Microlitros
µm	Micrômetros
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
RawIntDen	“Densidade integrada bruta” do inglês “Raw Integrated Density”
VHS	Velocidade de hemossedimentação sanguínea

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Leishmaniose e <i>Leishmania</i>	21
1.2 Flebotomíneos	24
1.3 Manutenção de colônias de flebotomíneos em laboratório	29
1.4 Análise de imagem	38
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Material biológico	44
4.1.1 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	44
4.1.2 <i>Hamster</i>	44
4.2 Avaliação do uso da membrana Parafilm® M tratada com Plasma gel para a alimentação sanguínea <i>in vitro</i> de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em laboratório	44
4.2.1 Preparação do Plasma gel e tratamento da membrana Parafilm® M	44
4.2.2 Ensaio de alimentação <i>in vitro</i>	46
4.2.3 Ensaio de alimentação <i>in vivo</i>	48
4.3 Comparação da metodologia de análise de imagem com a metodologia de dosagem de hemoglobina para avaliar o repasto dos insetos após os ensaios de alimentação (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	48
4.3.1 Estimativa do tamanho do repasto pela dosagem de hemoglobina	49
4.4 Estabelecimento de um protocolo de processamento de imagens para estimar o tamanho do repasto sanguíneo das fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	50
4.4.1 Captação e calibração (mm) das imagens	50
4.4.2 Estimativa da área do abdômen e da região de coloração vermelha	52
4.5 Análises estatísticas	54
5. RESULTADOS	55
5.1 Estabelecimento de um protocolo de processamento de imagens para estimar o tamanho do repasto sanguíneo das fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	56
5.2 Comparação da metodologia de análise de imagem com a metodologia de dosagem de hemoglobina para avaliar o repasto dos insetos após os ensaios de alimentação (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	62

5.3	Avaliação do uso da membrana Parafilm® M tratada com Plasma gel para a alimentação sanguínea <i>in vitro</i> de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em laboratório	67
5.3.1	Influência da idade pós emergência dos insetos adultos no tamanho do repasto sanguíneo dos flebotomíneos	68
5.3.2	Influência da idade pós emergência dos insetos adultos na porcentagem de flebotomíneos alimentados	72
6.	DISCUSSÃO	75
7.	CONCLUSÕES	86
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
9.	ANEXOS	98
9.1	Glossário dos termos utilizados na análise de imagem e recursos do programa Fiji ImageJ	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses e *Leishmania*

As leishmanioses são doenças negligenciadas que ocorrem em várias regiões do mundo sendo que as populações mais afetadas, majoritariamente, estão localizadas na América Latina e em países em desenvolvimento. Depois da malária e da tripanossomíase africana (doença do sono), as leishmanioses são a terceira mais importante doença causa por parasitos transmitidos por vetores (WHO 2021). Existem quatro formas da doença: a leishmaniose visceral, a leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose cutâneo difusa.

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, é fatal se não for tratada em 95% dos casos. Apresenta episódios irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. A maioria dos casos de LV ocorrem no Brasil, África Oriental e na Índia. Estima-se que ocorram, por ano, de 50.000 a 90.000 novos casos de LV em todo o mundo, sendo que apenas entre 25 a 45% desses casos são relatados à Organização Mundial da Saúde (OMS). No ano de 2019, mais de 90% dos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO 2021).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma mais comum da doença, e causa lesões cutâneas (úlceras), em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes para toda a vida e graves incapacidades. Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. É estimado que ocorram entre 600.000 e 1 milhão de novos casos de LC, por ano em todo o mundo. Mais de 87% dos casos de LC registrados no ano de 2019 ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do), Iraque, Líbia, Paquistão, República Árabe Síria e Tunísia (WHO 2021).

A Leishmaniose mucocutânea causa a destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta. Cerca de 90% dos casos de Leishmaniose muco cutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO 2021). Seguramente, estes dados são subestimados, uma vez que nem todos os países afetados apresentam um sistema de notificação compulsória de casos, e mesmo aqueles que o fazem, enfrentam problemas logísticos que aumentam a imprecisão das estimativas (Singh et al. 2006, Bern et al. 2008, Quaresma 2011, Queiroz et al. 2012).

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) ocasiona um quadro constituído por macrófagos vacuolados e repletos de parasitos, obscurecendo as estruturas da derme e da hipoderme (padrão macrofágico). As primeiras descrições de LCD destacaram manifestações clínicas

maculopapulonodulares, semelhança com a hanseníase virchowiana, disseminação, cronicidade, riqueza parasitária e resistência aos tratamentos. A LCD ocorre na Bolívia, Venezuela e Brasil (Silva 1945, Convit et al. 1946, Barrientos 1948).

As leishmanioses são causadas por protozoários heteróxeos pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. A infecção humana pode ser causada por mais de 20 espécies, que incluem o complexo *L. donovani* com 2 espécies (*L. donovani* e *L. infantum* no Novo Mundo), o complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*), *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, e o subgênero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. [V.] braziliensis*, *L. [V.] guyanensis*, *L. [V.] panamensis* e *L. [V.] peruviana*). As espécies são morfologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por análise de isoenzimas, métodos moleculares ou anticorpos monoclonais (Wright 1903, CDC - Global Health 2017).

Referindo-se a morfologia, *Leishmania sp.* podem ser encontradas nas formas amastigota (parasito intracelular sem flagelo livre), promastigota pró cíclicas, promastigota nectomona, promastigota leptomona, promastigota metacíclica, promastigota retroleptomona e promastigota haptomona. Vale destacar as formas promastigota metacíclicas, que são as formas infectantes para os hospedeiros vertebrados, encontradas na porção anterior do trato digestivo dos flebotomíneos, sendo bem pequenas, com flagelo muito longo (cerca de duas vezes maior do que o comprimento do corpo) dotadas de intensa mobilidade (Wenion 1926, Alexander et al. 1978).

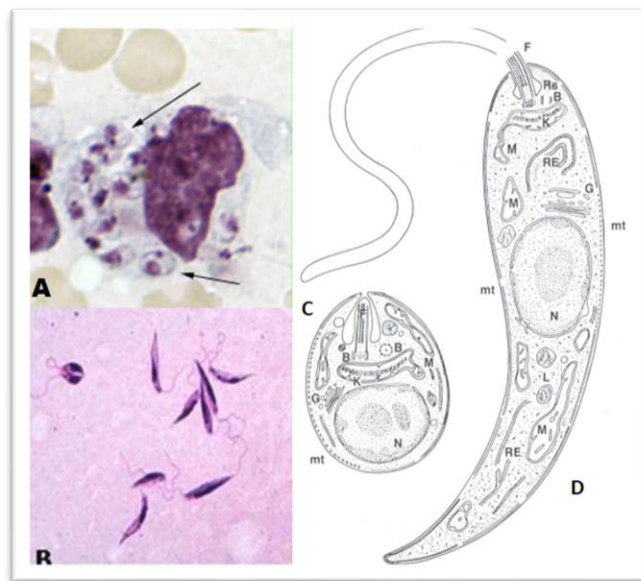


Figura 1: (A) Amastigotas de *Leishmania tropica* de uma biópsia cutânea. Nesta figura, um macrófago intacto está praticamente preenchido com amastigotas indicadas pelas setas, as quais têm um núcleo e cinetoplasto claramente visíveis (B), promastigotas de *Leishmania* sp. Desenhos esquemáticos das formas de *Leishmania* sp., amastigota (C) e promastigota (D). Fotos: (A) CDC, 2017; (B) Rocha, 2009; (C, D) Luís Rey, 2008.

A transmissão de *Leishmania* da forma congênita ou por meio de fluidos corporais infectados (transfusão sanguínea, transplante de órgãos, compartilhamento de agulhas contaminadas e fluidos genitais) é considerada rara e com importância limitada (Cruz et al. 2002, Quinnell et al. 2009). A transmissão com maior importância é, de fato, a vetorial. Tal transmissão ocorre por meio de mecanismo complexo, no momento da hematofagia de fêmeas infectadas de flebotomíneos. De forma bastante sucinta, as fêmeas infectadas regurgitam promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. As promastigotas inoculadas no local da picada são fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro. Dentro dos macrófagos as promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária simples e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares (Lainson et al. 1987)

Ao se alimentar de um hospedeiro infectado por *Leishmania*, as fêmeas de flebotomíneo ingerem junto do sangue células do sistema mononuclear fagocitário contendo formas amastigotas. Ao chegar no intestino do flebotomíneo, o parasito se diferencia na forma promastigota. Os parasitos do subgênero *Leishmania* se desenvolvem na porção média do intestino, enquanto que aqueles do subgênero *Viannia* o fazem na parte posterior. Em seguida, os parasitos sofrem profundas alterações morfológicas e modificações bioquímicas à medida que se transformam nas formas metacíclicas infecciosas (Chang et al. 1983). Com o

rompimento da matriz peritrófica por enzimas quitinolíticas das promastigotas (Schlein et al. 1991), os parasitos migram e se fixam nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio (Schlein 1993). A eficiência da transmissão de promastigotas metacíclicas depende da capacidade do parasito em induzir mudanças no flebotomíneo vetor, como a degeneração da válvula de Estomodeu (Schlein et al. 1992). A danificação da válvula leva a regurgitação do sangue ingerido pelo vetor, que promove a transmissão do parasito (Kamhawi et al. 2000). Dessa forma, quando as fêmeas infectadas realizarem um novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas serão regurgitadas, infectando um novo hospedeiro, e assim iniciando um novo ciclo biológico.

1.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos da ordem Diptera, apresentando como os demais insetos do grupo dois pares de asas, sendo um funcional, e o outro, atrofiado, conhecido por banlancim ou alteres, que auxilia o inseto no equilíbrio durante o voo. Eles pertencem a subordem Nematocera, cujos insetos são geralmente delicados, esguios, com patas longas e antenas compostas por vários seguimentos. Eles pertencem a família Psychodidae cujos representantes apresentam o corpo recoberto por cerdas em abundância (Killick-Kendrick 1999). Essa família compreende 6 subfamílias, das quais apenas Phlebotominae tem impacto na saúde humana (Lewis 1974, Lewis et al. 1977). No Brasil, os flebotomíneos são popularmente conhecidos por diferentes nomes, tais como asa branca, asa dura, biriqui, cangalhinha, mosquito palha, tatuquida, flebótomo (frebóti), dentre outros.

A importância desses insetos na parasitologia se deve ao hábito hematofágico das fêmeas, realizado a partir de picadas dolorosas. Até o momento estão descritas 927 espécies de flebotomíneos, distribuídas em dois gêneros, *Phlebotomus* na África, Europa e Ásia (região conhecida por velho mundo) e *Lutzomyia* nas Américas (região conhecida por Novo Mundo) (Shimabukuro & Galati 2011). No gênero *Lutzomyia* estão descritas aproximadamente 500 espécies, das quais 30 são vetoras do protozoário *Leishmania* (Young & Duncan 1994). Contudo é importante destacar que algumas espécies são também responsáveis pela veiculação de bactérias e arbovírus, bem como participam da reação de urticária Harara (Tesh et al. 1998).

Os flebotomíneos apresentam uma ampla distribuição geográfica, estando presentes em uma grande diversidade de ambientes sob diferentes condições climáticas e de altitude, nos ecótopos silvestre, rural e urbano. Eles podem ser encontrados em quase todos os habitats com temperaturas variando entre 16°C a 44°C e em altitudes que vão desde o nível do mar até acima de 1500 metros (Colacicco-Mayhugh et al. 2010). Contudo, predominam em áreas neotropicais

nas quais a densidade dos flebotomíneos oscila em função das estações climáticas do ano. A umidade é um fator determinante para a manutenção destes insetos nos abrigos, sendo encontrados em diferentes ambientes, desde áreas isoladas como grutas (Galati et al. 1997) a áreas urbanas, reforçando a hipótese da possível adaptação dos vetores e parasitos a ambientes modificados/antropizados e a animais domésticos como hospedeiros/reservatórios (Costa et al. 2007, Andrade et al. 2012, Kassen et al. 2012, Teles et al. 2013).

O ciclo de vida dos flebotomíneos acontece nos criadouros, contudo há de se considerar a dificuldade de determinação desses locais. Na América do Sul e Central, os criadouros apresentam-se em: i) solo terrestre de elevada umidade, porém não encharcado; ii) rico em material orgânico de origem vegetal em decomposição (podendo conter fezes de animais curtidas) e iii) com temperaturas que variam de 25°C a 28°C (Forattini, 1953). No ambiente rural ou silvestre, os criadouros geralmente são fendas de rochas, base de troncos de árvores com raízes tabulares, troncos ocos de árvores, solo de florestas sob arbustos e em tocas de animais. Por sua vez, no ambiente urbano tratam-se de quintais muito arborizados e sombreados, terrenos baldios com mato e lixo, bem como locais de criação de animais domésticos (Forattini et al. 1953, Killick-Kendrick et al. 1977, Killick-Kendrick 1999).

Os flebotomíneos apresentam ciclo de vida do tipo holometábolo, passando pelos estágios de ovo, larva (contendo quatro estádios larvais), pupa e adulto (Figura 2). As evidências de campo em regiões neotropicais, sugerem que existam de 3 a 4 gerações por ano (Forattini 1973, Brazil & Brazil 2003). Já na região do Mediterrâneo, os flebotomíneos completam de uma a três gerações por ano, dependendo da espécie e localidade (Alten et al. 2016).

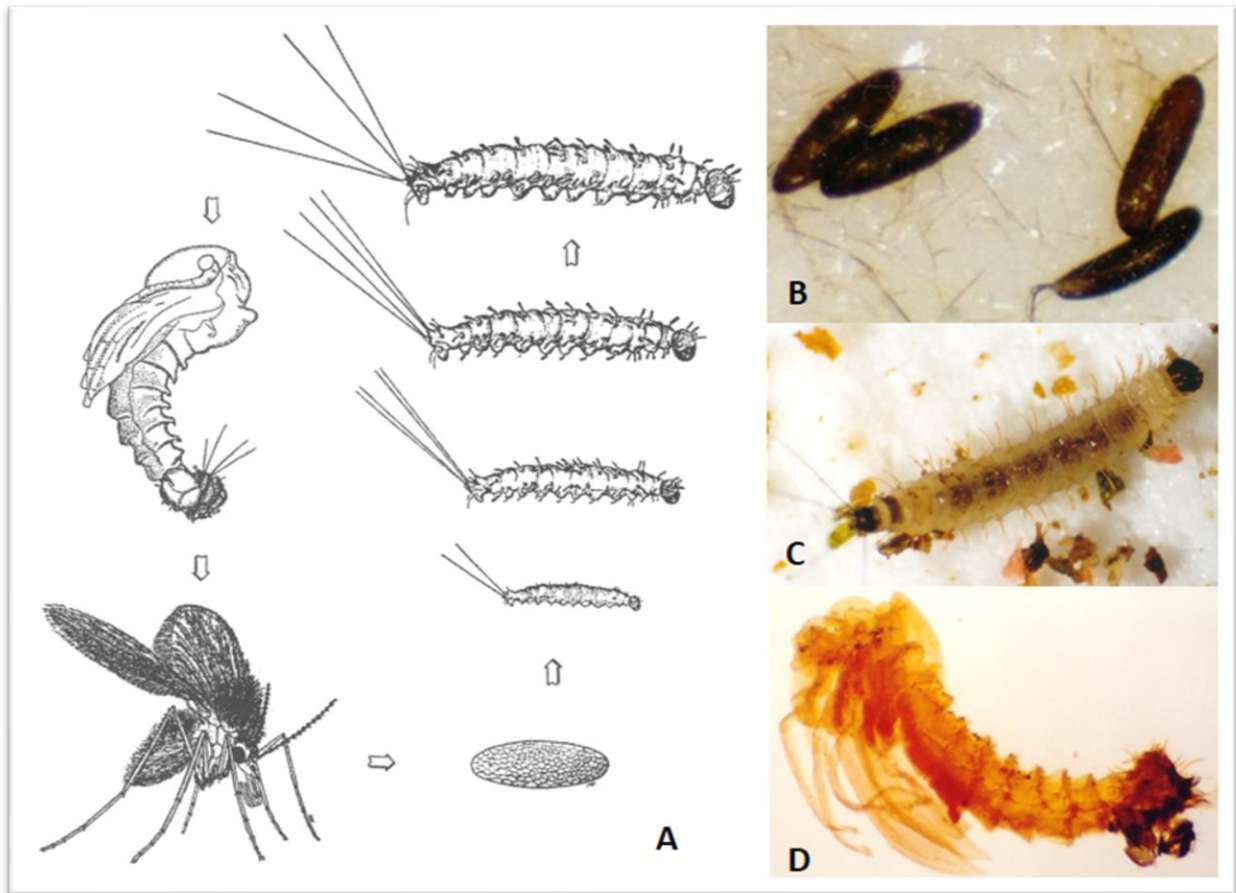


Figura 2: Ciclo de vida holometábolo dos flebotomíneos (A), ilustrando as fases de ovo (B), larva (C), e pupa (D). Fotos: (A) adaptado de Lawyer et al. 2000, (B, C, D) Wladimir Fasito do Vale.

O ciclo se inicia com os adultos, macho e fêmea, copulando. Os machos geralmente precedem as fêmeas por um ou dois dias, pois é necessário que a região posterior do seu abdômen gire 180° tornando-os aptos para a cópula. O momento da cópula varia de acordo com cada espécie, podendo acontecer: i) logo após o “nascimento” das fêmeas e ii) antes, durante ou após o repasto sanguíneo (Lawyer et al. 2017). Em geral, após a cópula, as fêmeas procuram um hospedeiro para o repasto sanguíneo, colocando, em seguida, os ovos. Em insetário, em condições ideais de temperatura e umidade, o período de incubação dos ovos varia de 4 a 10 dias (Killick-Kendrick & Killick-kendrick 1999).

Dos ovos eclodem as larvas que evoluem por quatro estádios. As larvas se alimentam de detritos de animais e vegetais presentes no criadouro. Entre um estádio e outro, sofrem as mudas, e deslocam sobre o substrato através de pseudópodes. Após 30 a 60 dias, elas se fixam ao substrato, perdem a cutícula (que fica amassada na base do inseto) e se transformam em pupa (Hanson 1961). As pupas são cilíndricas com tamanho aproximado de 2mm (Figura 2D). Elas apresentam coloração amarelada tornando-se mais escuras à medida que se aproximam da

muda. A fase pupal dura em média 10 dias, e a partir delas, emergem os adultos, machos ou fêmeas (Forattini 1973, Lawyer et al. 2000).

Os adultos são pequenos, com tamanho aproximado de 2 a 4mm. Eles apresentam: coloração palha; o corpo densamente coberto de cerdas finas; e posição da cabeça formando um ângulo de 90° com o eixo longitudinal do tórax. Quando vivos e em repouso, as asas são mantidas abertas em posição semiereta. Os adultos apresentam marcado dimorfismo sexual podendo ser diferenciados pela extremidade posterior do abdômen: nos machos ela é bifurcada (Figura 3A), enquanto que nas fêmeas é pontuda ou ligeiramente arredondada (Figura 3B) (Young 1979, Lawyer et al. 2000). Ambos os sexos se deslocam através de um voo curto, em saltitos e silencioso, apresentando uma capacidade de dispersão limitada (até 400 metros), quando comparado a outros insetos (Dye et al. 1991, Morrison et al. 1993). Em relação a alimentação, apresentam aparelho bucal picador sugador, contudo os machos tem mandíbulas rudimentares que não os permitem perfurar a pele e se alimentarem de sangue. Dessa forma, os adultos de ambos os sexos são fitófagos, já tendo sido encontrados no trato digestivo desses insetos frutose, glicose e sacarose (Lewis and Domoney 1966, Killick-Kendrick 1979). Contudo, as fêmeas também se alimentam de sangue, sendo fonte de proteínas e aminoácidos, necessários a maturação dos ovários (Harwood et al. 1979). Nas colônias em condições de laboratório, as fêmeas realizam apenas uma oviposição ao longo da vida, podendo colocar de 30 a 70 ovos (Buescher et al. 1984).

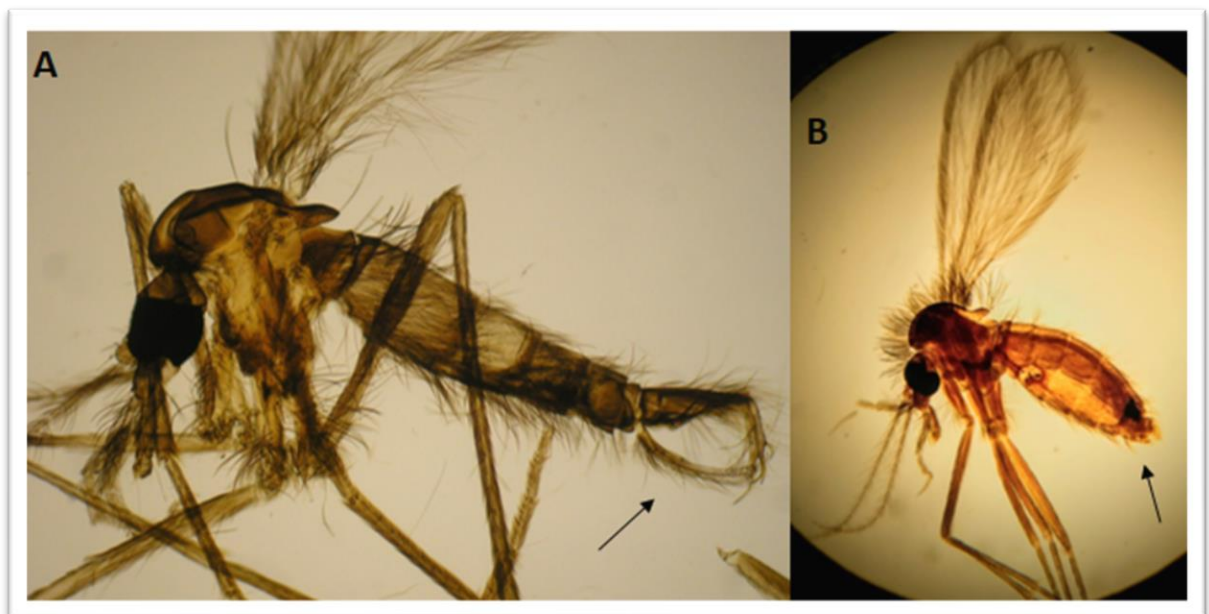


Figura 3: Adultos de *Lutzomyia longipalpis*: macho (A) e fêmea (B). As setas pretas indicam a extremidade posterior do corpo bifurcada nos machos enquanto nas fêmeas é pontuda e ligeiramente arredondada. Fotos: (A) José R. Botelho, (B) Luccas Malta

Como mencionado anteriormente, a presença de peças bucais curtas e rígidas nos flebotomíneos não os permitem retirar o sangue diretamente dos vasos (Lewis and Domoney 1966, Killick-Kendrick 1979). Nesse sentido, a hematofagia é do tipo telmofagia, ou seja, a fêmea do flebotomíneo lesa a derme do hospedeiro, cria um poço de sangue e alimenta-se nele. Esse tipo de alimentação se traduz em picadas dolorosas (Gordon et al. 1952). É importante destacar que a telmofagia também é importante para a infecção do flebotomíneo com *Leishmania*, já que esse parasito é encontrado nos macrófagos da pele do hospedeiro (Lane 1993, Handman et al. 2002).

Algumas espécies de flebotomíneos principalmente provenientes de áreas temperadas, podem apresentar períodos de diapausa, isto é, retenção temporária do desenvolvimento. As larvas de 4º estágio dessas espécies entram em diapausa e voltam a progredir quando o clima se torna favorável ao desenvolvimento larvário (Tesh 1988). Com este conhecimento, as coletas de flebotomíneos para o estabelecimento de colônias em laboratório, podem ser programadas para favorecer a captura de espécimes das primeiras gerações sazonais que não são prováveis de entrar em diapausa (Lawyer et al. 1991, Lawyer et al. 2017).

Referindo-se a *Lutzomyia longipalpis*, objeto de estudo desse trabalho, trata-se de uma espécie descrita em 1912 por Lutz & Neiva. Desde sua descrição, a ocorrência de *L. longipalpis* em áreas com casos de leishmaniose visceral na América Latina levava a hipótese de que essa espécie de flebotomíneo estivesse envolvida na transmissão de *Leishmania infantum*. Somente em 1977, Lainson et al. comprovaram, em condições controladas de laboratório, a transmissão de *L. infantum* por *L. longipalpis* a hamsters. Também no ano de 1977, foram capturadas em áreas com casos humanos de leishmaniose visceral em Santarém (PA), *L. longipalpis* infectadas com *L. infantum*. Destaca-se que na região, *L. longipalpis* era a única espécie de flebotomíneo encontrada, confirmando assim a hipótese de que essa espécie era vetora de *L. infantum* (Lainson 1984, Lainson 1985).

A distribuição de *L. longipalpis* é bastante ampla, estando presente desde a região norte do México até a região sul da Argentina (WHO 2019). A grande plasticidade genética e valência ecológica dessa espécie se reflete na presença dela nos ambientes silvestre, rural e urbano. Essa espécie apresenta limitada capacidade de voo, com uma dispersão média de 400 metros (Dye et al. 1991, Morrison et al. 1993). Nos ambientes rurais e urbanos, os adultos mostram-se bem adaptados à habitação humana, vivendo próximo aos criadouros de animais domésticos e a anexos peridomiciliares, a exemplo dos abrigos de animais domésticos (cão) e de criação (galinhas e porcos). Trata-se de uma espécie considerada oportunista, pois realiza hematofagia

em uma grande variedade de hospedeiros, o que favorece a infecção e/ou transmissão de *Leishmania*. A somatória desses fatores, faz de *Lutzomyia longipalpis* um grande desafio na perspectiva do controle da leishmaniose visceral (Zeledon et al. 1984, Aguiar et al. 1987, Passos-Dias et al. 2003, Barata et al. 2005, Missawa et al. 2008)

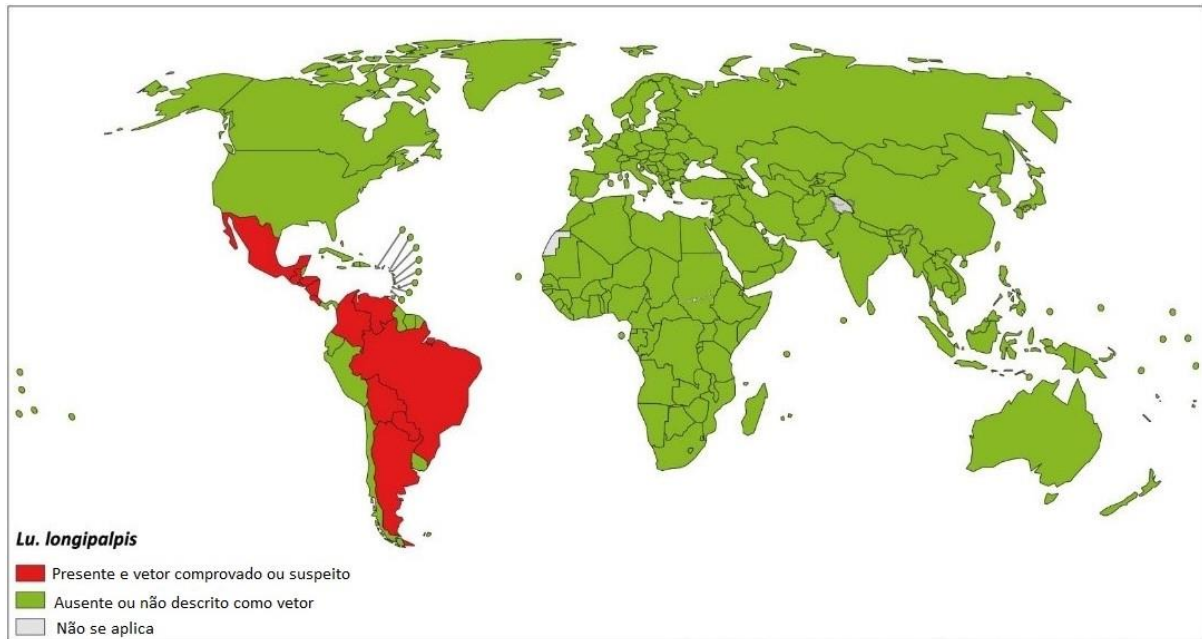


Figura 4: Distribuição mundial de *Lutzomyia longipalpis*. As áreas em vermelho correspondem a locais onde o vetor está presente e atua ou é suspeito de atuar como vetor do parasito *Leishmania spp.* e as áreas em verde correspondem aos locais onde o inseto não está presente ou não atua como vetor da leishmaniose. Fonte: WHO, 2019

1.3 Manutenção de colônias de flebotomíneos em laboratório

Apesar do conhecimento acumulado sobre os flebotomíneos as lacunas relacionadas principalmente aos criadouros e aos abrigos representam um grande desafio para o controle desses insetos no campo, impactando diretamente nos casos de leishmanioses. Adicionalmente, a limitação de informações sobre as condições ideais para o desenvolvimento dos flebotomíneos em suas diferentes fases de vida se traduzem como um fator que dificulta, ou até mesmo impede, o estabelecimento de colônias em insetários. Contraditoriamente, ao mesmo tempo que é necessário se conhecer mais sobre a biologia dos flebotomíneos para criá-los em insetário, grande parte do que se sabe sobre os estágios imaturos dos flebotomíneos foi a partir das colônias estabelecidas em laboratório, justificando a importância das criações em condições de laboratório (Safyanova 1964).

Até 1978, poucas eram as espécies de flebotomíneos que tinham sido mantidas em insetário por mais de dez gerações consecutivas, sendo elas: *Phlebotomus argentipes*,

Phlebotomus papatasi, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia sanguinaria*, *Lutzomyia gomezi* e *Lutzomyia flaviscutellata* (Killick-Kendrick 1978). No cenário mundial, um levantamento realizado em 2017, revelou a existência de 90 colônias de flebotomíneos, contemplando 21 espécies diferentes, distribuídas em 35 laboratórios localizados em 18 países. Referindo-se as espécies do novo mundo, foram registradas 28 colônias contemplando 6 espécies diferentes. Dessas colônias, 71,4% eram de *L. longipalpis*. Referindo-se as espécies do velho mundo, foram registradas 62 colônias contemplando 15 espécies diferentes. Dessas colônias, 33,9% eram de *P. papatasi* e 21% de *P. perniciosus*. Esses números, quando comparados a criação de outros insetos vetores (ex. *Aedes aegypti*,) revelam que são poucos os laboratórios que conseguiram estabelecer colônias de flebotomíneos em insetário, impactando, possivelmente, no número de estudos relacionados a esses insetos. Esse levantamento de 2017 revelou que as metodologias de criação utilizadas diferem entre os laboratórios muitas vezes por conta da disponibilidade de recursos, custos e de mão de obra qualificada. Nem todas as espécies de flebotomíneos respondem igualmente a essas diferentes metodologias de criação, podendo ser necessário que existam modificações específicas para atender as particularidades de cada espécie (Lawyer et al. 2017).

Desde a primeira descrição de criação de flebotomíneos por Grassi (1907), alguns outros trabalhos se seguiram (Hertig & Johnson 1961, Schmidt 1964, Gemetchu 1971, Christensen 1972, Sherlock & Sherlock 1972, Chaniotis 1975, Killick-Kendrick et al. 1977, Ward 1977, WHO 1977, Young et al. 1981) culminando no desenvolvimento da metodologia proposta por Modi & Teshi (1983). Esses autores descreveram uma metodologia de criação destinada a *L. longipalpis* e a *P. papatasi* (Figura 5). Após o repasto sanguíneo, 200 a 250 fêmeas grávidas eram transferidas para potes plásticos¹, para oviposição. Um pequeno pedaço de algodão embebido em frutose 30% ficava disponível aos insetos, externamente ao frasco, sobre o náilon, como fonte de água e açúcar. Os potes eram acondicionados em caixas plásticas tampadas contendo uma esponja úmida de forma a manter alta umidade. Por sua vez, as caixas eram mantidas em ambientes a 28°C, 60%-70% de umidade e fotoperíodo de 14 horas claro:10 horas escuro. Após a morte das fêmeas, elas eram retiradas dos potes com auxílio de uma pinça. Todos os ovos colocados por elas ficavam em contato com o gesso que recobre o fundo do pote. Por cima dos ovos era polvilhada uma fina camada de ração (mistura de fezes secas de coelho, ração

¹ Os potes tem capacidade de 500mL, apresentam no fundo uma camada de 2cm de espessura de gesso saturado sobreposta a 30 a 35 orifícios (7mm diâmetro) no fundo do frasco. Apresentam como tampa uma fina cobertura de náilon presa no corpo do frasco. Na lateral do frasco, tem-se um furo de dimensão mínima a permitir a inserção do captador de insetos, que deve permanecer tampado por um pedaço de algodão.

para coelho, fígado de boi em pó). Os potes eram verificados a cada 2 ou 3 dias, sendo adicionada ração. Após o nascimento dos adultos, 300 a 350 espécimes eram cuidadosamente transferidos para uma gaiola de náilon² com auxílio de um capturador. Dentro da gaiola, os adultos acasalavam e se alimentavam de frutose 30%, oferecido em um algodão. Por sua vez, a hematofagia das fêmeas era realizada em um *hamster* anestesiado com cloridrato de Ketamina. Retirado o *hamster* de dentro da gaiola, ela era colocada dentro de um saco plástico contendo uma esponja úmida, sendo mantida a 25° C. Segundo os autores, dispendo de uma dedicação à colônia de 2 a 3 horas/dia, a partir da preconização descrita, seria possível obter semanalmente de 4.000 a 5.000 adultos.

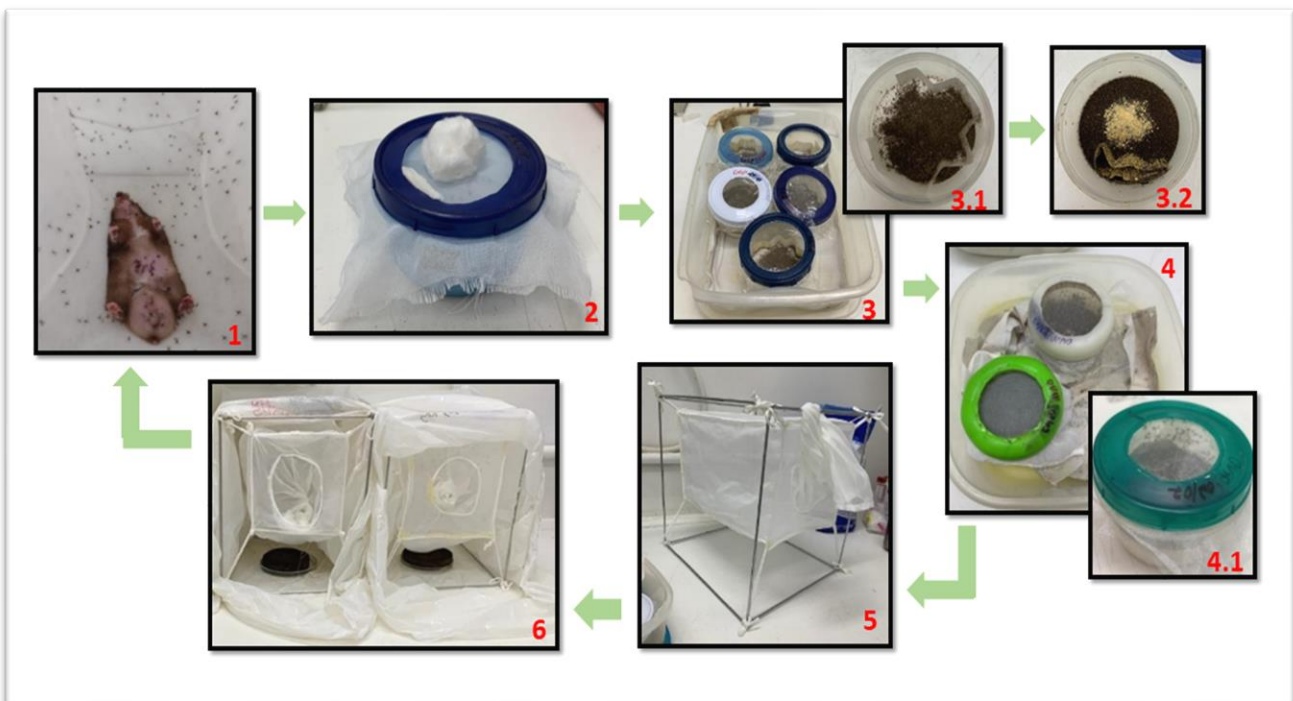


Figura 5: Esquema da metodologia de Modi & Teshi (1983) utilizada na manutenção da colônia do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (ICB-UFGM). (1) Fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* realizando repasto sanguíneo em *hamster* macho anestesiado com Thiopentax. (2) Cerca de 5 dias após o repasto, quando as fêmeas já realizaram a digestão do sangue ingerido, elas são transferidas junto aos machos para potes plásticos de oviposição fechados com voil. Dentro dos potes é colocado uma sanfona de papel filtro para aumentar a área de oviposição das fêmeas. (3) Após a morte dos insetos, o voil é retirado e substituído por plástico filme. (3.1) Larvas L1 e L2 alimentadas com ração composta por mistura de fezes secas de coelho, ração para coelho e húmus. (3.2) Larvas L3 e L4 alimentadas com proteína de soja e Neston®. (4) Plástico filme substituído por tecido voil. (4.1) Pupação seguida da emergência dos insetos adultos. (5) Soltura dos insetos adultos em gaiolas de nylon. (6) As gaiolas são colocadas dentro de sacos plásticos junto com esponjas humedecidas, as esponjas mantem a umidade necessária para a sobrevivência dos insetos. Foto: (1) Natália Saab

² As gaiolas devem apresentar área equivalente a 18cm³, sendo confeccionadas em náilon, cujas extremidades ficarão presas em uma estrutura de aço através de fios presos em seus oito cantos.

Apesar de parecer simples, na prática, a criação dos flebotomíneos é uma atividade laboriosa, que demanda, além de infraestrutura, recurso humano capacitado e dedicação. Existem algumas estratégias que podem ser adotadas para melhoria das colônias de laboratório. Podem ser feitos aportes periódicos de espécimes de campo, garantindo assim uma maior variabilidade genética para que a colônia consiga sobreviver a gargalos populacionais. Ao se introduzir a população selvagem deve-se ter cuidado para não infectar a colônia com algum patógeno (bactérias, ácaros, fungos, etc.). É muito importante que haja uma observação diária por uma ou mais gerações da colônia para que o pesquisador ou responsável técnico consiga obter características da progênie. Durante esse período de observação, dados sobre incubação dos ovos, muda de um estágio larval para outro, pupação e emergência de adultos deverão ser registrados em uma tabela de sobrevivência, para que posteriormente sejam analisados, resultando em uma tabela de vida específica por estágio. Também devem ser feitas anotações diárias de temperatura e umidade, do número médio de fêmeas alimentadas após cada repasto, bem como o número de machos e fêmeas removidos da colônia para fins de pesquisa. Isso porque todas essas variáveis podem impactar no tamanho da colônia e, por sua vez, na capacidade de crescimento. O repasto deve ser feito pelo menos três vezes por semana para auxiliar no estabelecimento da colônia, através do uso de cobaias anestesiadas ou membranas em aparelho artificial (Hemotek ou alimentador de vidro). E é aconselhado retirar o açúcar 24 horas antes do repasto (Lawyer et al. 2017).

Alguns fatores podem interferir na postura de ovos das fêmeas, como a quantidade de larvas/pote e de adultos/gaiola (Killick-Kendrick et al. 1987). As gaiolas devem medir 30x30x30 cm e acomodar até 3.000 adultos (Lawyer et al 2017). Já os potes de oviposição e de criação das larvas podem ter 6 cm (acomoda até 20 fêmeas grávidas) ou 14 cm (acomoda de 100-150 fêmeas grávidas) de diâmetro, variando de acordo com a demanda/produção da colônia (Volf et al. 2011). O período de diapausa de cada espécie também pode ocasionar a diminuição da oviposição. Para diminuir os impactos causados pela diapausa, pode-se coletar adultos selvagens para montar um estoque de colônia durante o primeiro pico populacional, quando é improvável que haja diapausa, evitando assim a coleta de ovos ou larvas de diapausa. Também é recomendado diminuir a temperatura do local de acondicionamento dos potes e, em seguida, ir aumentando aos poucos até que as larvas atinjam o estágio de pupa (Lawyer et al. 2017).

Os flebotomíneos adultos podem ser encontrados naturalmente infectados com uma variedade de protozoários, nematóides, cestóides, fungos, bactérias e vírus (Young et al. 1977, Warbug et al. 1991). Em alguns casos esse parasitismo pode ser benéfico, mas em outros pode

trazer consequências negativas para a colônia. Um exemplo bastante comum são as gregarinas, um parasito invertebrado apicomplexa que pode desenvolver uma relação comensal com o inseto. Porém esse parasito pode chegar a altos níveis de infestação e se tornar prejudicial a viabilidade das colônias. Infecções causadas por nematoides podem impactar na capacidade reprodutiva das fêmeas (fertilidade e fecundidade) (Dougherty & Ward 1991).

Os ácaros também podem parasitar colônias de flebotomíneos. Eles são muito difíceis de se evitar e já foram encontrados parasitando 16 gêneros e 39 espécies de flebotomíneos. Os ácaros deixam cicatrizes no exoesqueleto que podem ser prejudiciais ao inseto. Algumas espécies são entomofágicas e em grande número podem rapidamente dominar um pote de larvas, por isso seu controle deve ser iniciado rapidamente (Lewis et al. 1981). Os potes devem ser verificados para a presença de ácaros pelo menos uma vez por semana. Para controlar as infecções causadas por fungos e bactérias é importante disponibilizar a medida adequada de ração de acordo com a quantidade de larvas em cada pote e utilizar um tipo de ração que seja consumida rapidamente pelas larvas, evitando assim, o aparecimento de fungos e bactérias. As infecções por bactérias também podem ser controladas com o uso de antibióticos (penicilina/estreptomicina) adicionados ao açúcar disponibilizado aos adultos (Volf et al. 2011).

A metodologia proposta por Modi & Teshi (1983) tem sido a mais comumente adotada para a criação de *L. longipalpis*, evidentemente que incorporando alterações de forma a atender as especificidades dos insetários (ex. disponibilidade de pessoal qualificado para cuidar da colônia, espaço para acomodação de gaiolas, potes de oviposição e potes com larvas). Contudo, independente do detalhamento metodológico adotado, é necessário que seja ofertado as fêmeas dos flebotomíneos o repasto sanguíneo. Essa alimentação pode ser *in vivo*, a partir do uso de cobaias anestesiadas (Modi & Teshi 1983), ou *in vitro*, disponibilizando o sangue em alimentador artificial (Cosgrove et al. 1994). O mesmo racional se aplica para a realização das infecções experimentais dos flebotomíneos com *Leishmania*. Tal infecção pode ser realizada *in vivo*, a partir da alimentação do inseto em uma fonte alimentar anestesiada previamente infectada com o patógeno (Paiva et al. 2007), ou *in vitro*, disponibilizando em alimentador artificial o sangue contendo o parasito (Diaz-Albiter et al. 2012).

A alimentação dos flebotomíneos *in vivo*, seja para a criação/manutenção de colônias ou infecção experimental, pressupõe a disponibilidade de uma fonte alimentar viva. Geralmente são utilizados *hamsters* (*Mesocricetus auratus*). Apesar da alimentação *in vivo* ser a situação

que mais se assemelha da realidade, o uso de cobaias traz consigo pontos relevantes. Nesse cenário, há de se considerar o impacto causado pela atividade experimental ao bem-estar das cobaias, devido ao estresse gerado pelo próprio manuseio e procedimento de anestesia. Adicionalmente, a manutenção das cobaias em biotério, seja ele próprio ou externo, se traduz em investimento de infraestrutura e de recursos financeiros e humanos que permitam a criação dos animais em concordância com as normas e regulamentações dedicadas ao uso de animais em experimentação.

Referindo-se a alimentação *in vitro*, sua realização pressupõe a existência de um equipamento adequado a disponibilização do sangue aos flebotômicos, seja para a criação/manutenção de colônias ou algum delineamento experimental via alimentação sanguínea (ex. infecção experimental). Essa metodologia dispensa o uso dos animais vivos e, por consequência, todo o sofrimento imputado a eles durante a atividade, bem como gastos relacionados a sua criação/aquisição. Inclusive, pode-se utilizar como fonte de alimentação sangue humano heparinizado, substituindo as cobaias completamente da metodologia de alimentação. A Heparina é utilizada como anticoagulante pois entre todos os outros compostos anticoagulantes disponíveis ela é a que mais se aproxima da alimentação realizada diretamente no hospedeiro mamífero. Apesar de causar menor impacto na atividade tripsinolítica intestinal de *L. longipalpis*, quando comparada a outros anticoagulantes como Citrato de sódio, a heparina naturalmente que impacta na alimentação do inseto vetor (Silva 2015). Adicionalmente, nos ensaios de infecção experimental é possível trabalhar com informações mais precisas, conhecendo-se a quantidade de parasitos disponível por unidade de sangue.

Nesse sentido, apesar de se reconhecer que a alimentação *in vitro*, quando comparada a *in vivo*, reduz significativamente o impacto relacionado ao uso de cobaias vivas, com ênfase no sofrimento e morte dos animais, não se pode negar a agressividade e complexidade inerente ao uso da pele de pintinho como membrana no Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, United Kingdom), ou em alimentador de vidro (Kontes Custom Glass, Vineland, NJ). A obtenção da pele de pintinho se dá a partir da eutanásia de filhotes de *Gallus gallus domesticus* com no máximo 7 dias de vida. Após eutanasiados, a pele da região abdominal e posterior dos filhotes é removida delicadamente. Em seguida, é feita uma incisão com auxílio de uma tesoura na região da cloaca, e a partir dessa incisão, a pele é descolada da musculatura. Dessa forma, seja para a criação/manutenção de colônias ou infecção experimental, é fundamental investigar outra(s) membrana(s) que possam ser utilizadas.

O alimentador de vidro consiste em um conjunto de estruturas cônicas feitas de vidro (Figura 6), conectadas por um circuito externo preenchido por água, que circula pelos vidros. O sistema mantém o sangue na temperatura ideal (37°C-39°C) através da circulação da água, via termocirculador conectado ao aparato de vidro, em sua superfície externa. As membranas são acopladas na abertura da base inferior da estrutura de vidro (Rutledge et al. 1964).



Figura 6: Sistema artificial de vidro utilizado para repasto sanguíneo de fêmeas de *Aedes aegypti* equipado com termocirculador (seta preta), com membrana acoplada a abertura inferior da estrutura de vidro do aparato (seta vermelha). Fonte: Dias et al. 2020

Apesar da existência do alimentador de vidro (Kontes Custom Glass, Vineland, NJ), a alimentação *in vitro* de diferentes modelos biológicos tem sido comumente realizada utilizando o Hemotek (Hemotek Ltd.) (Figura 7). O equipamento possui um termostato que permite ajuste preciso da temperatura do sangue, favorecendo a alimentação artificial e o inóculo de parasitos/patógenos nos experimentos de infecção artificial. Este equipamento foi inicialmente projetado para a alimentação de culicídeos (Cosgrove et al., 1994). O Hemotek (Hemotek Ltd) é composto por um pequeno reservatório cilíndrico de alumínio (3,7 cm de diâmetro). A parte inferior do reservatório, que entrará em contato com os insetos, é coberta por uma membrana de alimentação (pele de pintinho, membrana de colágeno, Parafilm®, etc). O reservatório

comporta até 5ml de sangue, possuindo no lado oposto onde a membrana é fixada dois orifícios vedados com tampa de plástico removível, um para introduzir o sangue e outro para a saída do ar, facilitando o seu enchimento.



Figura 7: (A) Aparato Hemotek montado para a alimentação artificial de *L. longipalpis* ajustado em cima do pote telado onde os insetos são mantidos durante o repasto. (B) Detalhe do reservatório (c), do anel de vedação (seta vermelha) e do suporte termostatizado (t), onde o reservatório é acoplado, formando a unidade de alimentação. O aparelho permite a utilização em simultâneo de até cinco unidades de alimentação. O volume de sangue utilizado para uma refeição padrão de flebotomíneos é de 2ml. Foto: (A) Mauricio Sant'Anna (B) Manual do equipamento (Hemotek Ltd).

Com vistas a tornar mais semelhante a alimentação *in vitro* e a *in vivo*, dois pontos merecem atenção: i) a temperatura na qual o sangue será ofertado ao inseto no alimentador artificial e ii) a membrana utilizada no equipamento como interface inseto-sangue, que simula grosseiramente, a pele do hospedeiro vivo. Nesse sentido, o uso do Hemotek para realização do presente projeto visou um maior controle das condições da alimentação *in vitro*, bem como obtenção de uma maior reprodutividade dos experimentos e homogeneidade dos resultados.

Por fim, é importante destacar, devido ao caráter artificial da alimentação *in vitro*, a ausência de vários estímulos importantes para a alimentação dos insetos (ex. cheiro dos hospedeiros). Isso pode impactar na qualidade da hematofagia realizada e, conseqüentemente, nos indicadores diretamente relacionados a ela (ex. tempo necessário para iniciar a alimentação; tempo necessário para concluir a alimentação; volume total de sangue ingerido) refletindo, assim, no desenvolvimento dos insetos (ex. fecundidade; tempo de sobrevivência dos insetos).

A primeira alimentação de artrópodes hematófagos com membranas foi feita por Rodhain et al. no ano de 1912, que alimentaram moscas tsé tsé (*Glossina spp.*) com sangue não aquecido e citratado através de uma membrana de pele de rato. Adler & Theodor (1927) foram

os primeiros a realizar a alimentação por membrana com flebotomíneos, quando usaram uma membrana feita de pele de coelho para infectar *Phlebotomus papatasi* com *L. infantum* Nicolle e *L. braziliensis sensu lato*, a partir de emulsões dos parasitos em soro inativado ou sangue desfibrinado de coelho. Experimentos controle também foram realizados com *Leishmania tropica* (Wright) em *P. papatasi* infectados de forma semelhante. Ward em 1974, alimentou *L. flaviscutellata* capturados na natureza com sangue de galinha a 37°C, através de membranas feitas a partir de pele de filhote de camundongo e pele de pintinho.

Denlinger et al. (2016), demonstraram que fêmeas de *P. papatasi* se alimentam através de uma membrana Parafilm utilizando o sistema de alimentação Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, Reino Unido). Foram usadas duas membranas para alimentação *in vitro*: intestino de porco lavado com água destilada e Parafilm. O Parafilm foi enrolado no braço de um voluntário durante 10 minutos para absorver o suor e odores, com o intuito de atrair as fêmeas para a fonte de sangue aquecida. Foram feitas 4 repetições de cada combinação de tratamento: sistema de alimentação, com membrana (Parafilm e intestino de porco), 250 ou 500 fêmeas adultas de *P. papatasi*, e com ou sem exalações de CO₂. O aumento do percentual de fêmeas alimentadas com exalação de CO₂ foi mais visível no Hemotek com Parafilm com 500 fêmeas. O uso do Parafilm com suor foi uma combinação bem-sucedida para atrair fêmeas de *P. papatasi*. O resultado obtido sugere e apoia que uma combinação de odores corporais (suor) com CO₂ funciona como uma isca potente para flebotomíneos e que essas combinações podem ser consideradas como sistemas alternativos de alimentação, ao invés do uso de roedores, por reduzirem os custos associados a manutenção das colônias de biotério. Essas técnicas também reduzem os riscos potenciais de segurança e a necessidade de protocolos associados à manutenção e manuseio de animais e substâncias anestésicas.

Após realização do repasto sanguíneo das fêmeas dos flebotomíneos, a confirmação do mesmo é fundamental para assegurar a continuidade das atividades, sejam elas a criação/manutenção das colônias e/ou atividades de experimentação que demandam que os insetos se alimentem. Nesse sentido, uma ferramenta disponível é a dosagem de hemoglobina. Essa técnica pode ser por métodos manuais utilizando espectrofotômetro ou por automação em contadores hematológicos.

O método mais comumente utilizado para a dosagem de hemoglobina, e que foi utilizado durante a realização do presente estudo, é o cianometemoglobina, que tem como princípio a oxidação ao estado férrico do Fe (II) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e

carboxihemoglobina, pelo ferricianeto formando hemoglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemoglobina (HiCN). Esse método tem em sua composição o cianeto de potássio, um reagente altamente tóxico, que por si só, já justifica a busca por metodologias de quantificação do repasto sanguíneo menos tóxicas e agressivas para os seres humanos e o meio ambiente (Queiróz 2022). Contudo, é importante destacar que a execução dessa técnica exige a disponibilização de equipamentos relacionados (leitor de Elisa, pipetas, geladeira, balança, microhomogenizador), materiais de consumo (placas de cultura, ponteiras) e recurso humano capacitado. Frente a tais limitações, o uso de imagens poderia ser um importante aliado para tais estudos.

1.4 Análise de imagem

A grande maioria dos dados das pesquisas realizadas na área da biologia são obtidos a partir de imagens. O uso da tecnologia microscópica automatizada nos últimos anos e o volume e a complexidade dos dados de imagens obtidos através dela aumentaram tanto ao ponto de ser impossível analisa-los sem o uso de computadores e *softwares*. Portanto, os biólogos dependem cada vez mais de pesquisadores da área da computação para desenvolver novos softwares que possibilitem a análise dessas imagens. Indiscutivelmente, a análise de imagem computadorizada supera as limitações de um observador humano (Turing 1953, Altschul et al. 1990, Myers et al. 1990). Os variados tipos de dados de imagens requerem técnicas de visão computacional para, por exemplo, reconstruir volumes de partes sobrepostas, procurar características biologicamente relevantes, rastrear características no espaço e no tempo, e comparar espécimes por meio de mapeamentos de atlas digitais (anatômicos ou celulares) (Bao et al. 2006, Megason et al. 2007, Keller et al. 2008, Fowlkes et al 2008, Murray et al. 2008, Long et al. 2009, Anderson et al. 2009, Neumann et al 2010, Collinet et al. 2010, Fernandez et al. 2010, Shariff et al. 2010, Saalfeld et al. 2010, Peng et al. 2010).

O programa Fiji é um software que foi desenvolvido principalmente para a análise de imagens de microscópio eletrônico de varredura e de raio X. Ele foi criado para aumentar a imagem de microscópios eletrônicos possibilitando a caracterização de elementos, que não era possível com as ferramentas já disponíveis. Um dos pacotes oferecidos pelo Fiji, livre e de código aberto, mais populares para a análise imagens é o ImageJ, que inclui uma grande variedade de bibliotecas organizadas, plugins relevantes para pesquisa biológica, linguagens de script, tutoriais e documentação abrangentes. Sua primeira versão foi lançada no ano de 1997 e desenvolvida por Wayne Rasband, voluntário no Instituto Nacional de Saúde em Maryland nos

Estados Unidos. O ImageJ se trata de um software gratuito que utiliza a linguagem de programação Java. O software cresceu ao longo dos anos, saindo de um aplicativo pequeno utilizado nos Institutos Nacionais de Saúde (NIH), para um programa de alcance internacional e que conta com centenas de colaboradores e milhares de usuários (Schindelin et al. 2012, Springer Science+Business Media 2018).

O Fiji atualiza a arquitetura subjacente do ImageJ e permite que os pesquisadores se concentrem no processo de desenvolvimento de soluções inovadoras e de ponta para análise de imagens biológicas. As ferramentas avançadas para análise de imagem, em conjunto com a facilidade e familiaridade da interface de usuário do ImageJ, atraiu muitos pesquisadores para a plataforma (Schindelin et al. 2012). O programa também fornece aos usuários ferramentas para geração de pipelines avançados (técnica de hardware que permite que a CPU realize a busca de uma ou mais instruções) para o processamento de imagens, por meio de linguagens de script (linguagem de programação que suporta programas escritos para um sistema que automatiza a execução de tarefas que seriam executadas, uma de cada vez, por um operador humano) e bibliotecas capazes de processar grandes quantidades de imagens ao mesmo tempo. O software ImageJ, como dito anteriormente, possui diversos recursos nativos que foram utilizados neste trabalho, tais como: ferramentas de seleção, compatibilidade com vários formatos de imagens, ajustes de cor e histograma, ferramentas de medição automáticas, escala de imagens e segmentação (Rueden et al. 2016).

Guerra (2020) utilizou o Fiji ImageJ para analisar imagens obtidas em experimentos de microscopia intravital de *Cimex lectularius*. Fêmeas de *C. lectularius* (10 dias em jejum) foram alimentadas durante 60 minutos, em alimentador artificial de vidro conectado a um termocirculador para manter a temperatura do sangue entre 37-39°C, utilizando um pedaço de luva de látex lavada como membrana, com 5ml de sangue humano heparinizado, contendo 200µl de fluorocromo laranja de acridina (0,05%, preparado em salina 0,9%). O processo de salivação foi investigado, por microscopia intravital, através da alimentação dos insetos na pele da orelha de camundongos *hairless* anestesiados via intraperitoneal. As fêmeas de *C. lectularius* foram alimentadas na orelha dos camundongos, para observação da deposição de saliva fluorescente na pele do hospedeiro. Foi visualmente avaliado o tipo de vaso utilizado; ocorrência de alterações no diâmetro dos vasos (vasoconstrição e/ou vasodilatação); a presença ou não de hemorragias; ganho de peso (peso final - peso inicial; mg); e tempo total de alimentação, sondagem e ingurgitamento (min).

Os experimentos de microscopia intravital foram filmados com auxílio de uma câmera (Canon EOS 600D) acoplada a um microscópio de epifluorescência (Leica DM 500). As filmagens produzidas foram analisadas através do programa Fiji ImageJ. A partir das ferramentas disponíveis no ImageJ, foi delimitada uma área fixa (máscara) abrangendo todo o sítio de alimentação (área de sondagem e vaso canulado). Por meio do recurso PADI de variação da densidade integrada (*Integrated Density – IntDen*), foi estimada a liberação de saliva fluorescente e a movimentação da parede dos vasos. Foi observado que a deposição de saliva ocorre durante toda a alimentação dos insetos, começando no momento em que as peças bucais entram em contato com a derme do hospedeiro. Sendo depositada em maior quantidade na fase de sondagem e em menor quantidade, na fase de ingurgitamento.

Indiscutivelmente o Image J é um programa de fácil instalação que facilita a interação entre biólogos e especialistas em programação, e possui uma função de atualização que permite um rápido retorno entre o desenvolvimento e o uso de seus componentes (Rueden et al. 2016). Contudo, não existe, até o momento, nenhuma metodologia que permita a avaliação do repasto sanguíneo de flebotomíneos, sendo esse, portanto, um dos objetivos desse trabalho.

2. JUSTIFICATIVA

A distribuição atual de *Lutzmoyia. longipalpis* é bastante ampla, estando presente desde a região norte do México até a região sul da Argentina (WHO 2019). A grande plasticidade genética e valência ecológica dessa espécie se reflete na presença dela nos ambientes silvestre, rural e urbano, nos quais apresenta comportamento hematofágico oportunista, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros, favorecendo, assim, a manutenção do ciclo de *Leishmania sp.* agente etiológico da leishmaniose (Killick-Kendrick 1999).

Sabendo-se da importância dos estudos com *L. longipalpis*, a criação da espécie em insetário é considerada estratégica. Contudo, trata-se de uma atividade complexa e laboriosa, na qual poucos pesquisadores obtêm sucesso. A metodologia proposta por Modi & Tesh (1983) tem sido a mais comumente adotada para a criação e manutenção de *L. longipalpis*, incorporando modificações que atendam as especificidades de cada insetário (ex. disponibilidade de pessoal qualificado para cuidar da colônia, espaço para acomodação de gaiolas, potes de oviposição e potes com larvas). Um ponto importante para a manutenção dos flebotomíneos é a oferta do repasto sanguíneo às fêmeas, seja *in vivo*, a partir do uso de cobaias (Modi & Tesh 1983), ou *in vitro*, utilizando alimentador artificial (Cosgrove et al. 1994). Nesse cenário, pode-se também pensar nas infecções experimentais dos flebotomíneos com *Leishmania*, podendo ser realizada *in vivo*, utilizando cobaias previamente infectadas, ou *in vitro*, a partir cepas do parasito mantidas artificialmente e ofertadas aos insetos no alimentador artificial. Tanto a alimentação *in vivo* quanto a *in vitro* apresentam vantagens e desvantagens, contudo, o aperfeiçoamento da técnica *in vitro*, pensando na redução e/ou eliminação do uso cobaias no processo, é desejável (Denlinger et al. 2016).

Atualmente a alimentação *in vitro* dos flebotomíneos, seja para a criação/manutenção de colônias ou infecção experimental, tem sido realizada com auxílio do Hemotek (Discovery Workshops, Reino Unido) (Denlinger et al. 2016). Para a execução de tais atividades o sangue humano é ofertado a 37° C aos insetos sendo utilizada como membrana, na interface sangue-flebotomíneo, a pele de pintinho (*Gallus gallus domesticus*) (Ward 1974). É importante mencionar que os flebotomíneos não se alimentam satisfatoriamente quando são utilizadas outras membranas. Considerando a agressividade e complexidade do processo para se obter a pele de pintinho, justifica-se a importância desse trabalho que investigou a eficiência de uma membrana composta de Parafilm® M associada a Plasmagel na alimentação artificial,

comparando-a à pele de pintinho, na perspectiva de sua substituição. Adicionalmente, tal membrana foi comparada à eficiência observada na alimentação *in vivo* utilizando *hamster*.

Para a confirmação do repasto sanguíneo, tradicionalmente realizada pela metodologia de dosagem de hemoglobina, desenvolveu-se nesse trabalho um método de análise de imagens. A técnica de dosagem de hemoglobina apesar de sensível é muito laborasiosa, exigindo o desenvolvimento de muitas etapas. Isso pode desencadear diversos erros (ex: perda de amostras, degradação dos reagentes pela luz, erros de pipetagem, erros ao montar as placas, etc.), principalmente quando o n amostral é grande comprometendo, assim, a confiabilidade dos resultados. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma técnica de imagem mais simples e que exija menor infraestrutura - pode trazer ganhos consideráveis, principalmente em ensaios que exijam que os insetos sejam mantidos vivos após a avaliação do repasto.

Acreditamos que os resultados obtidos nesse trabalho podem agregar conhecimento prático tanto na criação/manutenção dos flebotomíneos em condições de laboratório, quanto na avaliação do repasto sanguíneo em estudos nos quais a alimentação é um fenômeno importante a ser considerado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Otimizar a análise de imagem para estimar o tamanho do repasto de *Lutzomyia longipalpis* e avaliar o Parafilm® tratado em alimentador artificial.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o uso da membrana Parafilm® M tratada com Plasma gel para a alimentação sanguínea *in vitro* de *Lutzomyia longipalpis* em laboratório;
- Avaliar a influência da idade pós emergência dos insetos adultos no repasto sanguíneo das fêmeas;
- Comparar a metodologia de análise de imagem com a metodologia de dosagem de hemoglobina para avaliar o repasto dos insetos após os ensaios de alimentação (*in vitro* e *in vivo*);
- Estabelecer um protocolo de processamento de imagens para estimar o tamanho do repasto sanguíneo das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

4.1.1 *Lutzomyia longipalpis*

Foram utilizados *Lutzomyia longipalpis*, procedentes de Teresina (PI). Os flebotomíneos vem sendo mantidos em colônia fechada no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (ICB-UFMG) desde 2008, em condições controladas de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (80-95%). A criação dos insetos foi realizada em concordância com metodologia de Modi e Teshi (1983). Após a emergência, os adultos foram liberados em gaiolas de criação (náilon) envoltas por um saco plástico. Dentro dos sacos plásticos contendo as gaiolas foi inserida uma esponja embebida em água com o objetivo de manter os insetos em um ambiente com alta umidade (>80%). Os insetos foram alimentados *ad libitum* com solução de sacarose a 15% em algodão hidrófilo e mantidos sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. De 3 a 4 dias após a muda, as fêmeas eram colocadas para realizarem o repasto sanguíneo em *hamster* anestesiado.

4.1.2 Hamster

Foram utilizados nos experimentos *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) (40 a 60 dias de vida, de 100 a 150 gramas) criados no biotério do Departamento de Parasitologia (ICB-UFMG), mantidos em gaiolas com a água e ração *ad libitum*. Destaca-se que os *hamsters* utilizados nos experimentos não tiveram contato prévio com flebotomíneos ou com o anestésico utilizado. Para a alimentação da colônia e para os testes de alimentação *in vivo*, os *hamsters* foram anestesiados com Thiopentax (100 μl /100g) (CEUA 262/2021).

4.2 Avaliação do uso da membrana Parafilm® M tratada com plasmagel para a alimentação sanguínea *in vitro* de *Lutzomyia longipalpis* em laboratório

4.2.1 Preparação do plasma gel e tratamento da membrana Parafilm® M

Tanto para o preparo do plasma gel como para alimentação dos insetos *in vitro* foi utilizado sangue humano coletado por punção venosa com auxílio de tubos de coleta a vácuo (Vacutainer®) contendo heparina de sódio (0,04 μl heparina/ml de sangue). Após a coleta, 4 ml do sangue heparinizado foi centrifugado a 4000g durante 15 minutos para separar as hemácias (pellet) do plasma (sobrenadante). O sobrenadante foi retirado delicadamente com auxílio de uma seringa (Figura 8A) então submetido de 6 a 20 ciclos de aquecimento em aparelho micro-ondas, na potência máxima, com duração de 2 segundos/cada. O plasma era retirado de 2 em 2

ciclos para verificação da consistência. O aquecimento foi interrompido quando o material se “solidificou” por completo atingindo o aspecto gelatinoso característico do plasma gel (Figura 8B). Após o seu preparo, o plasma gel foi acondicionado em tubo eppendorf lacrado com Parafilm® para não sofrer nenhuma contaminação ou interferência de odor e mantido na geladeira (4 °C).



Figura 8: (A) Plasma obtido após centrifugação do sangue; (B) Plasma gel formado após os ciclos de aquecimento apresentando o seu aspecto gelatinoso característico.

O tratamento da membrana Parafilm® foi realizado após 60-150 minutos do preparo do plasma gel. Meia hora antes dos experimentos, e com a membrana acoplada ao reservatório de sangue do alimentador artificial (Hemotek), uma pequena quantidade do plasma gel (Figura 9A) foi espalhada cuidadosamente sobre toda a superfície da membrana de forma homogênea até secagem completa à temperatura ambiente (Figura 9B).

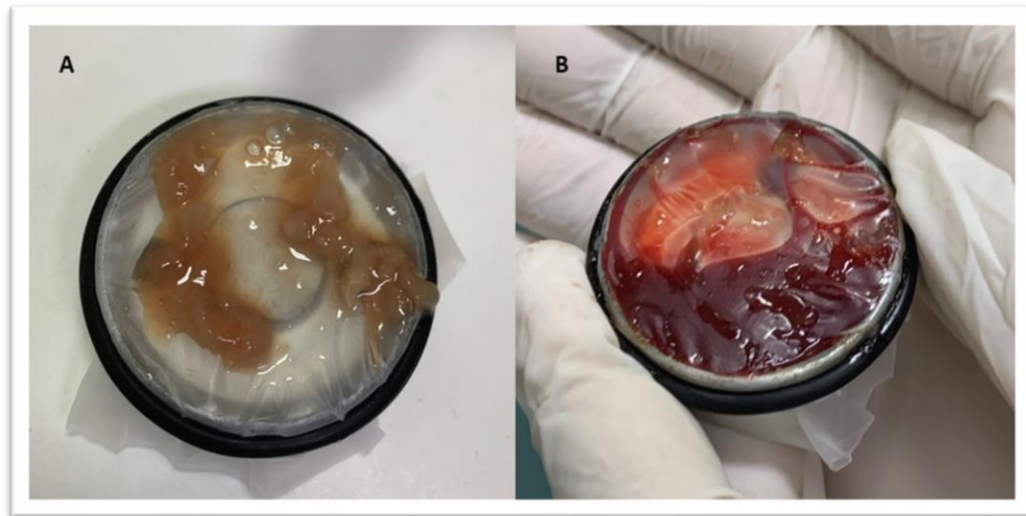


Figura 9: (A) Membrana artificial (Parafilm® M) acoplada ao reservatório do Hemotek pelo anel de vedação logo após aplicação do plasma gel. (B) Membrana após secagem do plasma gel e com reservatório cheio de sangue.

4.2.2 Ensaio de alimentação *in vitro*

Para os testes de alimentação, foram utilizados insetos adultos com diferentes idades (3, 4, 5 e 6 dias) pós emergência. Os flebotomíneos receberam solução açucarada 15% *ad libitum* até 24 h antes dos experimentos, quando foram separados em potes devidamente identificados, contendo 30 fêmeas e 6 machos, em cada. Após a separação nos potes, os insetos foram mantidos em jejum por 24 horas antes da realização dos ensaios, com intuito de deixá-los mais ávidos no momento da alimentação (Lawyer et al. 2017). Os machos foram utilizados na estimulação do repasto sanguíneo das fêmeas e na atração das mesmas para a fonte de sangue artificial (Lawyer et al. 2017). A utilização de insetos com idades diferentes foi com o intuito de avaliar se o tempo pós emergência influencia no tamanho do repasto sanguíneo e na proporção de fêmeas alimentadas.

O pote utilizado nos ensaios foi do tipo coletor universal com capacidade de 80 ml. Sua tampa foi adaptada para permitir o contato dos insetos com a membrana presa ao alimentador artificial. Para isso, a região superior foi recortada e posteriormente foi colado um voil com cola quente. Uma pequena abertura lateral foi feita para facilitar a inserção dos insetos com o auxílio do capturador de castro. Em seguida, a abertura foi fechada com um pedaço de esponja para evitar a saída dos insetos.

Foram avaliadas três membranas e/ou tratamento para alimentação sanguínea *in vitro* dos flebotomíneos: i) membrana de pele de pinto [Controle positivo (C+)], considerada padrão ouro (Ward 1974); ii) Parafilm® M [Controle negativo (C-)] e iii) Parafilm® M tratado com

plasma gel [Plasma gel (PG)]. O sistema de alimentação artificial utilizado para o repasto dos insetos foi o Hemotek (Hemotek Ltd, UK), onde foi oferecido sangue heparinizado humano mantido à 37°C, por 90 minutos.

Os potes contendo os insetos foram dispostos dentro de um isopor que ficou fechado durante os experimentos de alimentação (Figura 10A), com intuito de evitar interferência de odor ou luz externa, que pudessem comprometer o repasto sanguíneo das fêmeas. Considerando que a presença de um hospedeiro exalando CO₂ próximo aos insetos durante a alimentação artificial impacta positivamente no repasto sanguíneo (Denlinger et al. 2016), um *hamster* foi mantido dentro do isopor durante os experimentos de alimentação *in vitro* (Figura 10B). Próximo a metade de cada experimentos de alimentação artificial (~45 minutos) o sangue do reservatório do Hemotek era homogeneizado manualmente de forma delicada. Os experimentos foram realizados dentro do insetário sob condições controlada de temperatura (25±1°C) e umidade (80-95%).

Cada uma das membranas e/ou tratamento (C+, C- e PG) foi avaliada nos experimentos de alimentação *in vitro* por pelo menos três grupos de insetos de cada idade (3, 4, 5 e 6 dias) pós emergência. Cada dia típico de experimento de alimentação *in vitro* possuía nove grupos de insetos de determinada idade, três para cada membrana e/ou tratamento. Estes nove experimentos eram realizados com mesmo sangue e com o plasma gel produzido no dia. Como o sistema de alimentação artificial Hemotek possui apenas cinco reservatórios de sangue, para que os nove grupos de insetos fossem alimentados, foram necessárias duas baterias de experimento com intervalo de ~120 minutos entre elas. Assim, os experimentos foram planejados para que em cada bateria fosse avaliado pelo menos um grupo de cada membrana e/ou tratamento (C+, C- e PG), sendo uma triplicata de cada membrana e/ou tratamento.

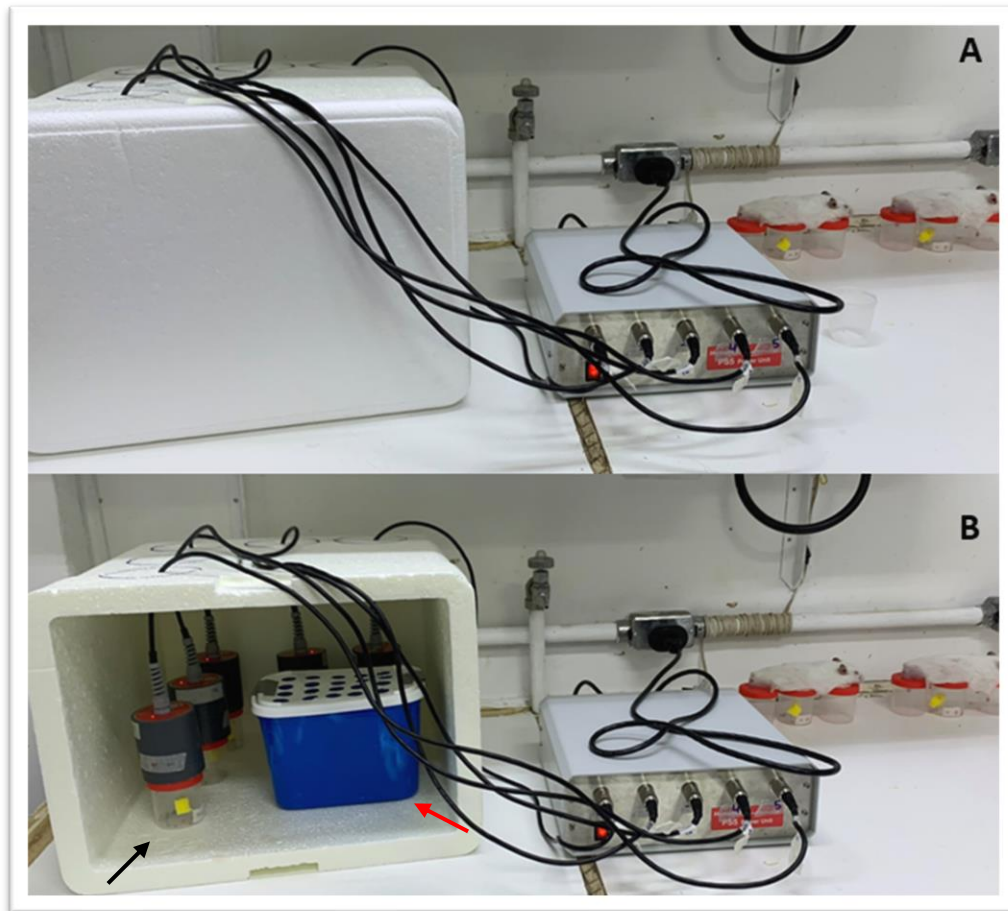


Figura 10: (A) Caixa de isopor fechada durante o teste de alimentação *in vitro* com as unidades de alimentação conectadas a unidade controladora do Hemotek. (B) Caixa de isopor destampada mostrando as unidades de alimentação sobre os potes contendo os insetos (seta preta) e o recipiente onde o hamster foi mantido durante o experimento (fonte de liberação de CO₂) (seta vermelha).

4.2.3 Ensaio de alimentação *in vivo*

Além dos testes de alimentação artificial, foram realizados na mesma data e local experimentos de alimentação *in vivo* utilizando *hamsters* anestesiados como hospedeiros [*Hamster* (H)]. Estes experimentos também foram realizados em triplicata com insetos de mesma idade pós emergência. Os insetos foram separados em potes e mantidos da mesma maneira descrita para os experimentos de alimentação *in vitro*. Os *hamsters* tiveram os pelos da região abdominal previamente raspados onde os potes contendo os insetos foram posicionados. O tempo de alimentação *in vivo* também foi de 90 minutos.

4.3 Comparação da metodologia de análise de imagem com a metodologia de dosagem de hemoglobina para avaliar o repasto dos insetos após os ensaios de alimentação (*in vitro* e *in vivo*)

Para a avaliação do repasto dos insetos foram utilizadas duas metodologias distintas baseadas na dosagem de hemoglobina e na análise de imagem. Visando comparar estas duas

metodologias, uma parte dos insetos do presente trabalho foi avaliada por ambas. Assim, após os experimentos de alimentação (*in vitro* e *in vivo*), os potes contendo os insetos foram colocados em freezer (~10 minutos à -20 °C) para eutanásia, sendo em seguida organizados em placas de petri e fotografados para posterior análise de imagem. Também foram fotografados insetos eutanasiados em jejum [Branco (B)]. Após as fotos, os grupos de insetos com 4 e 5 dias pós emergência dos testes de alimentação *in vivo*, *in vitro* e do grupo B foram processados para a dosagem de hemoglobina.

4.3.1 Estimativa do tamanho do repasto pela dosagem de hemoglobina

A estimativa do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos foi realizada utilizando um kit comercial para dosagem de Hemoglobina (Labtest Diagnóstica S.A). Neste kit, o Fe (II) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto formando hemiglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemoglobina (HiCN), sendo mensurado a 540 nm em espectrofotômetro. A solução de uso do reagente Drabkin foi obtida pela diluição do reagente de cor do kit (10 ml) em 990 ml de água destilada (concentração final: ferricianeto de potássio 0,607 mmol/L, cianeto de potássio 0,768 mmol/L) e estocado em frasco de vidro âmbar, protegido da luz. Conforme recomendação do fabricante, após o preparo, o reagente de cor Drabkin ficou armazenado à temperatura ambiente.

Para a determinação da hemoglobina ingerida pelos flebotomíneos, cada fêmea proveniente dos testes de alimentação (*in vitro* e *in vivo*) e do grupo B, depois de eutanasiada, foi transferida para tubo eppendorf (0,5 ml) contendo 20µl de Drabkin. Em seguida, a amostra foi macerada com o auxílio de um micro homogeneizador. Após a maceração foi acrescentada 380µl de Drabkin ao tubo, em seguida o material foi submetido a centrifugação por 5 minutos a 10.000g. Finalmente, foi retirado 300µl do sobrenadante (correspondendo 3/4 do volume final) e transferido para um poço de placas de cultura do tipo ELISA.

Como padrão de referência do ensaio colorimétrico foi utilizado o sangue heparinizado humano (item 4.2.2). A curva padrão foi obtida pela diluição seriada (fator 2) do sangue variando de 5,0 a 0,002 µl em 12 poços da placa de microtitulação (placa de cultura - 96 poços) contendo reagente de Drabkin (volume final de 300 µl). Após ser montada/completada contendo as amostras individuais de fêmeas provenientes dos testes de alimentação, 5 fêmeas do grupo B e a curva padrão em triplicata, a placa foi lida em aparelho espectrofotômetro à 540 nm (Figura 11).

A leitura dos insetos provenientes dos testes de alimentação foi subtraída da leitura média das fêmeas do grupo branco (5/placa). A partir do valor obtido o volume de sangue ingerido foi estimado, utilizando a equação da regressão linear da curva padrão. E considerando que o volume transferido para placa foi 3/4 do volume total após a maceração das fêmeas, no final o volume de sangue ingerido estimado por fêmea foi corrigido em 25%.

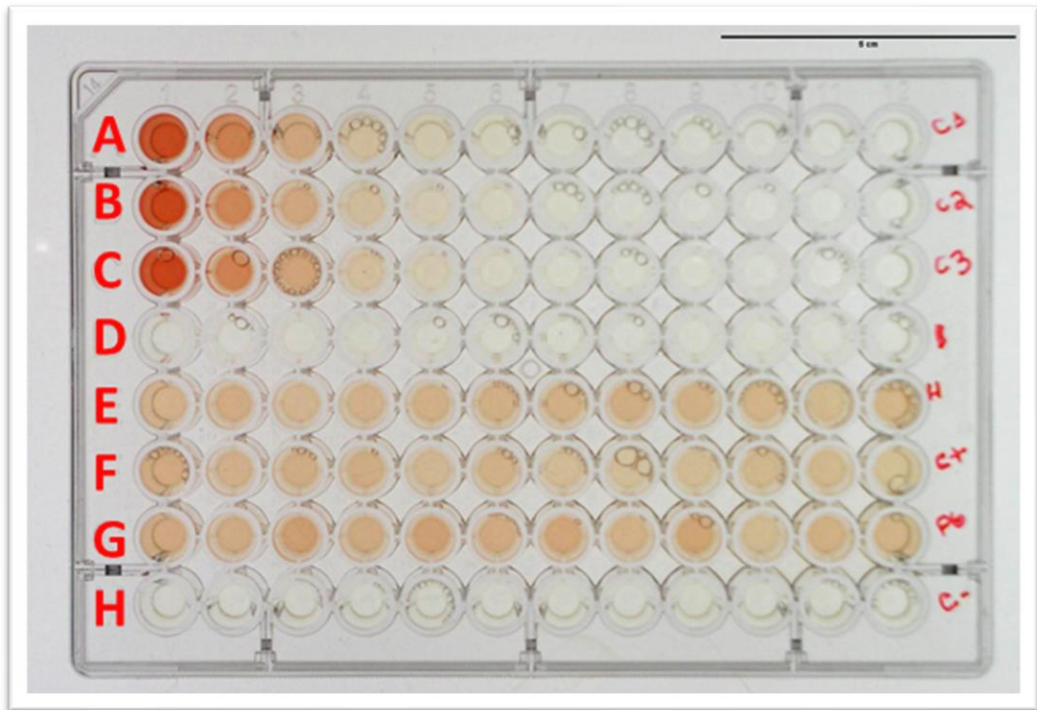


Figura 11: Disposição típica das amostras por linha (A-H) na placa de cultura confeccionada para a dosagem de hemoglobina visando estimar o volume de sangue ingerido pelas fêmeas após os testes de alimentação (*in vitro* e *in vivo*). A, B e C: Curvas padrão; D: Branco (B); E: *Hamster* (H); F: Controle positivo (C+); G: Plasma gel (PG); H: controle negativo (C-)

4.4 Estabelecimento de um protocolo de processamento de imagens para estimar o tamanho do repasto sanguíneo das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

4.4.1 Captação e calibração (mm) das imagens

Ao final de cada teste de alimentação os insetos foram posicionados em placas de petri plásticas forradas com EVA branco, em decúbito lateral, de forma que as patas e as asas não ficassem sobre o abdômen impedindo a demarcação das áreas abdominal e do sangue ingerido. Cada placa foi devidamente identificada com etiqueta de papel milimetrado de acordo com o grupo experimental dos insetos em questão (B, C-, C+, H e PG). As lacas com os insetos devidamente posicionados e identificados eram posicionadas sobre um transluminador de luz LED, sendo em seguida, fotografadas com auxílio de uma câmera (Casio Ex-Fh20) equipada com lente macro, fixada em um tripé. A placa contendo os insetos também recebeu iluminação

superior com o auxílio de um anel de luz LED acoplado à câmera digital. As imagens produzidas (3456x2592 pixels) foram analisadas com o programa Fiji ImageJ (1.53f51). Os termos e os recursos utilizados no processamento das imagens dos insetos estão no Glossário (Anexo 1).

Após acertar o histograma da imagem (RGB) a calibração original foi trocada de pixels para milímetros (mm). Assim, foram traçadas linhas (5) de 10 mm sobre o papel milimetrado de cada foto (*Straight lines*). Em seguida, os valores dos comprimentos das linhas traçadas em pixels foram mensurados (*analyze + measure*). Uma vez calculada a correspondência média entre as medições de pixel em mm, a imagem foi calibrada em mm (*analyze + set scale*) e desta forma, foi possível introduzir uma barra de escala em mm na imagem (*analyze + tools + scale bar*).

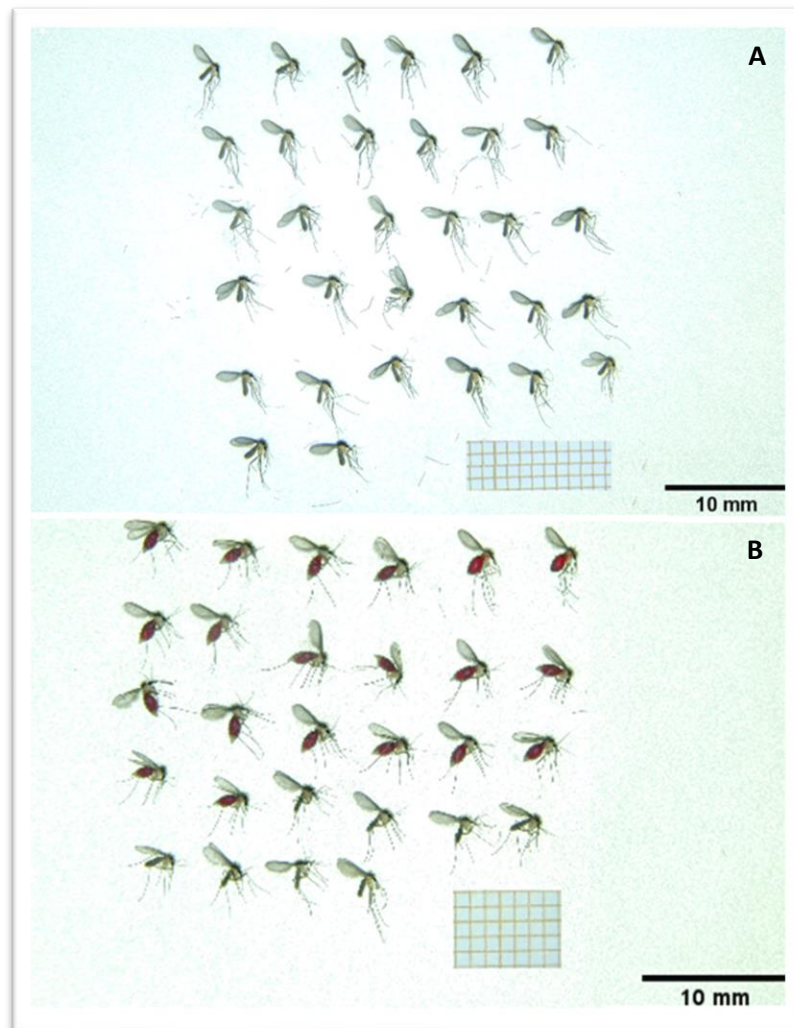


Figura 12: Imagens de grupos de flebotomíneos calibradas (mm) com auxílio do programa Fiji ImageJ. (A) grupo de fêmeas em jejum (B); (B) grupo de fêmeas após o teste de alimentação *in vitro* com membrana Parafilm[®] M tratada com plasma gel (PG).

4.4.2 Estimativa da área do abdômen e da região de coloração vermelha

O primeiro passo para estimar a área do abdômen dos insetos após os testes de alimentação foi estabelecer um protocolo composto por ferramentas de processamento de imagem para a criação de uma seleção que delimitasse o contorno do abdômen denominado máscara abdômen (M-AB). Assim, a partir da imagem do inseto (RGB) (Figura 13A) foram utilizados os seguintes recursos para a obtenção da M-AB: i) Demarcar a região divisória entre o tórax e o abdômen com uma linha azul (*Polygon selection*) (Figura 13B); ii) Decompor a imagem RGB nos seus componentes primários (vermelho, verde e azul/escala de cinza) (*image + color + split channel*) e selecionar a imagem correspondente ao seu componente azul (Figura 13C); iii) Converter a imagem do componente azul em imagem preto e branco 8-bit (*process + binary + make binary*) (Figura 13D). iv) Selecionar o contorno do abdômen (*Wand tool*) (Figura 13E); v) Criar e salvar a M-AB (*roi manager + add + more + save*) (Figura 13F).

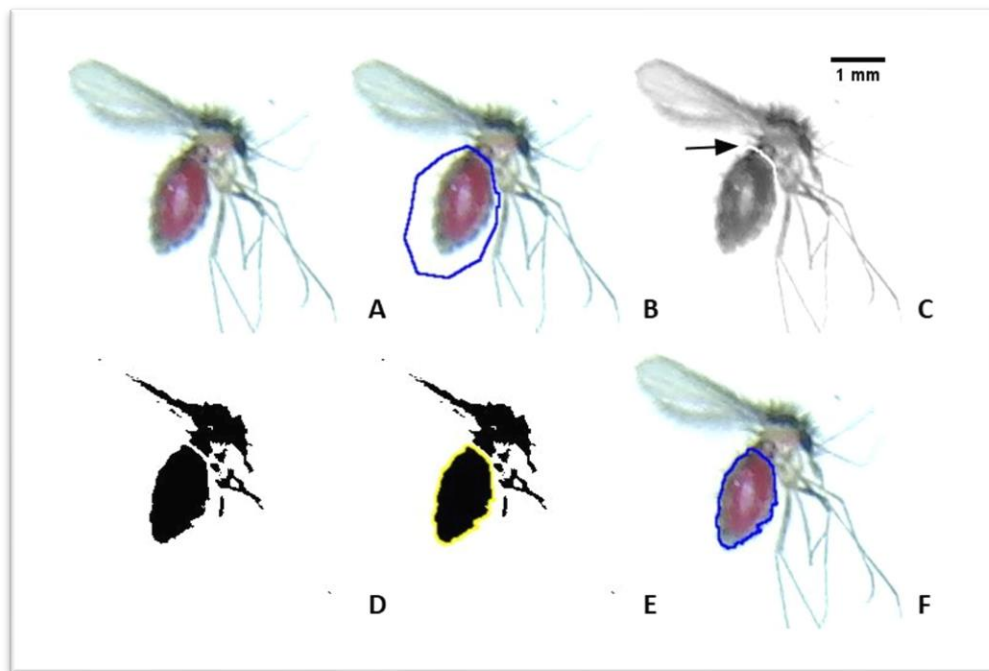


Figura 13: Criação da máscara do contorno do abdômen das fêmeas de flebotomíneo. (A) Imagem colorida (RGB) de uma fêmea após o teste de alimentação (B) Região limítrofe entre o tórax e o abdômen demarcado em azul. (C) Imagem anterior convertida no seu componente azul em tom de cinza. (D) Imagem anterior convertida em preto e branco 8 bits. (E) Contorno do abdômen selecionado em amarelo (F) Máscara abdômen (M-AB) representada pela linha azul. Legenda: A seta indica a separação gerada entre o abdômen e o restante do corpo da fêmea de flebotomíneo.

Para a estimativa da área vermelha, após os testes de alimentação, o primeiro passo também foi estabelecer um protocolo para criar uma seleção, que delimitasse a área de coloração vermelha, correspondente a região do abdômen e/ou do tórax onde o sangue ficou estocado/acumulado, denominada de máscara sangue (MS). Assim, a partir da imagem do

inseto (RGB) após o experimento de alimentação (Figura 14A) foram utilizados os seguintes recursos para a obtenção da máscara SG: i) Converter a imagem RGB em imagem CIELAB (*image + color + RGB to CIELAB*) e selecionar a imagem correspondente ao componente “a” (componente verde-vermelho) (Figura 14B); ii) Converter a imagem do componente “a” 32 bit (CIELAB) em escala de cinza 8-bit (*image + type + 8-bit*); iii) Converter imagem em escala de cinza em preto e branco (*image + adjust + threshold*), ajustando o formato/tamanho da região preta para que correspondesse a região vermelha da imagem colorida (RGB), sendo em seguida, selecionada (*wand tool*) (Figura 14C); iv) Criar e salvar a MS (*roi manager + add + more + save*) (Figura 14D).

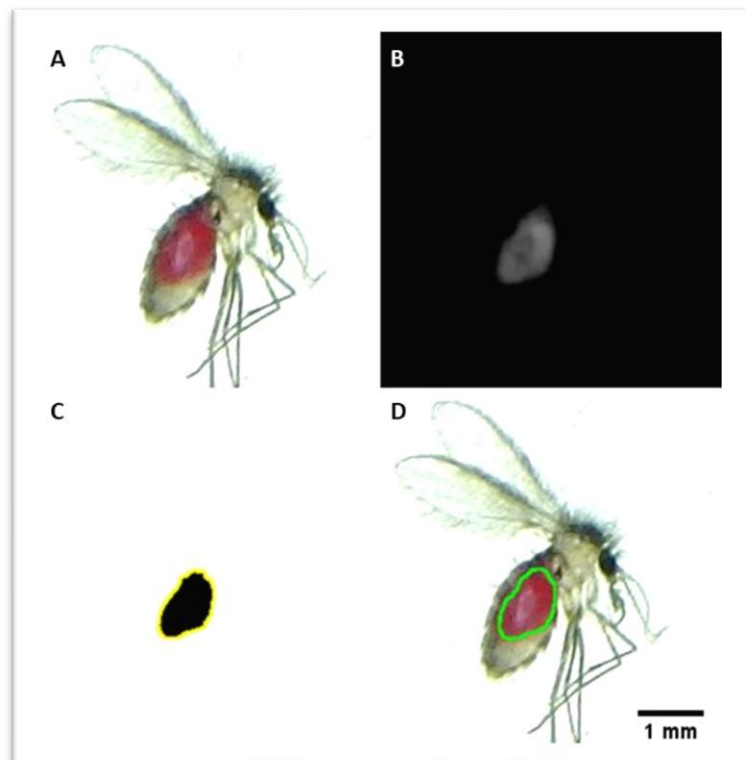


Figura 14: Criação da máscara do contorno da cor vermelha corpo das fêmeas de flebotomíneo. (A) Imagem colorida (RGB) de uma fêmea após o teste de alimentação. (B) Imagem anterior convertida em CIELAB mostrando o seu componente “a” (verde-vermelho) (C) Imagem anterior convertida em preto e branco 8-bit mostrando a região preta selecionada em amarelo. (D) Máscara da região vermelha do corpo (MS) representada pela linha verde.

Após a criação e o salvamento dos arquivos das máscaras correspondentes ao contorno do abdômen (M-AB) e das regiões vermelha no corpo das fêmeas após os testes de alimentação (MS), o próximo passo consistiu em selecionar os parâmetros (*analyze + set measurements*) que foram incluídos nas análises do presente trabalho (área, comprimento e largura). As

imagens dos grupos de insetos de diferentes idades oriundos de todos os grupos experimentais/controles (B, C-, C+, H e PG) foram carregadas, uma de cada vez, juntamente com as respectivas máscaras (M-AB e/ou MS) (*file + open*) e os parâmetros selecionados foram calculados/mensurados com auxílio do programa Fiji/Imagej (*roi manager + more + multi measure*). Finalmente, os dados gerados (*results table*) foram copiados e colados numa planilha Excel para a tabular os dados e confeccionar os gráficos.

4.5 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados gerados pelas duas metodologias utilizadas no presente estudo, baseadas na dosagem de hemoglobina e na análise de imagem foi realizada com auxílio do software Past 4.11 analisados tabulados com auxílio do programa Excel. Variáveis com distribuição normal foram testadas pelo ANOVA (no caso de mais de 2 grupos) seguido pelo teste de Tukey para identificar diferenças entre os grupos. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para comparar proporções. $P < 0.05$ foi considerado como significante. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Parte dos resultados foram analisados a partir de gráficos *Box-plot*, com intuito de avaliar a simetria dos dados, sua dispersão e a existência ou não de “outliers” (valores atípicos). Também foram feitas análises de regressão linear, para comparar quantitativa e qualitativamente as metodologias de dosagem de hemoglobina e análise de imagem.

5. RESULTADOS

Os dados utilizados neste estudo foram provenientes de insetos de cinco gerações distintas (5 experimentos independentes) totalizando 1889 fêmeas. Todas foram incluídas nas análises de imagem, sendo que destas, 1053 fizeram parte dos ensaios de dosagem de hemoglobina (Tabela 1).

Tabela 1: Dados dos grupos experimentais e controles utilizados nos testes de alimentação (*in vitro* e *in vivo*) discriminando quais deles foram incluídos nas análises de imagens e/ou nos ensaios de dosagem de Hemoglobina.

Experimento	Idade pós emergência	Grupo experimental (GE)	Nº total GE	Nº análise de imagem	Nº dosagem hemoglobina
1	3 DIAS	C- 1	30	30	0
		C- 2	32	32	0
		C- 3	21	21	0
		C+ 1	28	28	0
		C+ 2	32	32	0
		C+ 3	27	27	0
		H1	29	29	0
		H2	23	23	0
		H3	28	28	0
		PG 1	31	31	0
		PG 2	31	31	0
		PG 3	29	29	0
2	4 DIAS	B	30	30	0
		C- 1	31	31	31
		C- 2	30	30	30
		C- 3	28	28	28
		C+ 1	34	34	34
		C+ 2	31	31	31
		C+ 3	26	26	26
		H1	28	28	28
		H2	27	27	24
		H3	28	28	28
		PG 1	26	26	26
		PG 2	29	29	29
PG 3	25	25	24		
3	5 DIAS	B	32	32	0
		C- 1	30	30	30
		C- 2	29	29	29
		C- 3	29	29	29
		C+ 1	29	29	29
		C+ 2	31	31	31
		C+ 3	30	30	30
		H1	23	23	23
		H2	29	29	29
		H3	29	29	29
		PG 1	30	30	30
		PG 2	29	29	29
PG 3	27	27	26		
4	5 DIAS	B	35	35	0
		C- 1	32	32	32
		C- 2	29	29	29
		C- 3	30	30	30
		C+ 1	29	29	29
		C+ 2	25	25	25
		C+ 3	26	26	26
		H1	30	30	30
		H2	33	33	33
		H3	22	22	22
		PG 1	28	28	28
		PG 2	29	29	29
PG 3	30	30	30		

Experimento	Idade pós emergência	Grupo experimental (GE)	Nº total GE	Nº análise de imagem	Nº dosagem hemoglobina
5	6 DIAS	PG 4	28	28	27
		C- 1	31	31	0
		C- 2	30	30	0
		C- 3	30	30	0
		C+ 1	30	30	0
		C+ 2	30	30	0
		C+ 3	33	33	0
		H1	22	22	0
		H2	33	33	0
		H3	30	30	0
		PG 1	29	29	0
		PG 2	31	31	0
		PG 3	33	33	0
		PG 4	30	30	0
Total			1889	1889	1053

*B: Grupo Branco, C-: Grupo Controle Negativo, C+: Grupo Controle Positivo, H: Grupo *Hamster*; PG: Grupo Plasma Gel

No presente estudo foram utilizadas duas metodologias distintas para avaliação do repasto dos insetos, sendo elas a dosagem de hemoglobina e a análise das imagens obtidas após os ensaios de alimentação. Assim, a primeira parte dos resultados aborda os dados referentes ao processamento e análise dos insetos. Em seguida, foi necessária uma validação prévia da análise de imagem como metodologia para estimar o repasto sanguíneo dos insetos antes de utilizá-la para este fim. Após a validação, foi feita uma comparação entre os dados obtidos através da análise de imagem com os dados obtidos por dosagem de hemoglobina. Por último, foram abordados os resultados referentes a avaliação da membrana Parafilm® M tratada com Plasma gel para alimentação artificial dos flebotomíneos em laboratório.

5.1 Estabelecimento de um protocolo de processamento de imagens para estimar o tamanho do repasto sanguíneo das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

O protocolo de processamento de imagem utilizado neste estudo permitiu a construção de M-AB que representou o contorno do abdômen, e de MS que indicou a área ocupada pelo sangue ingerido (Figura 15).

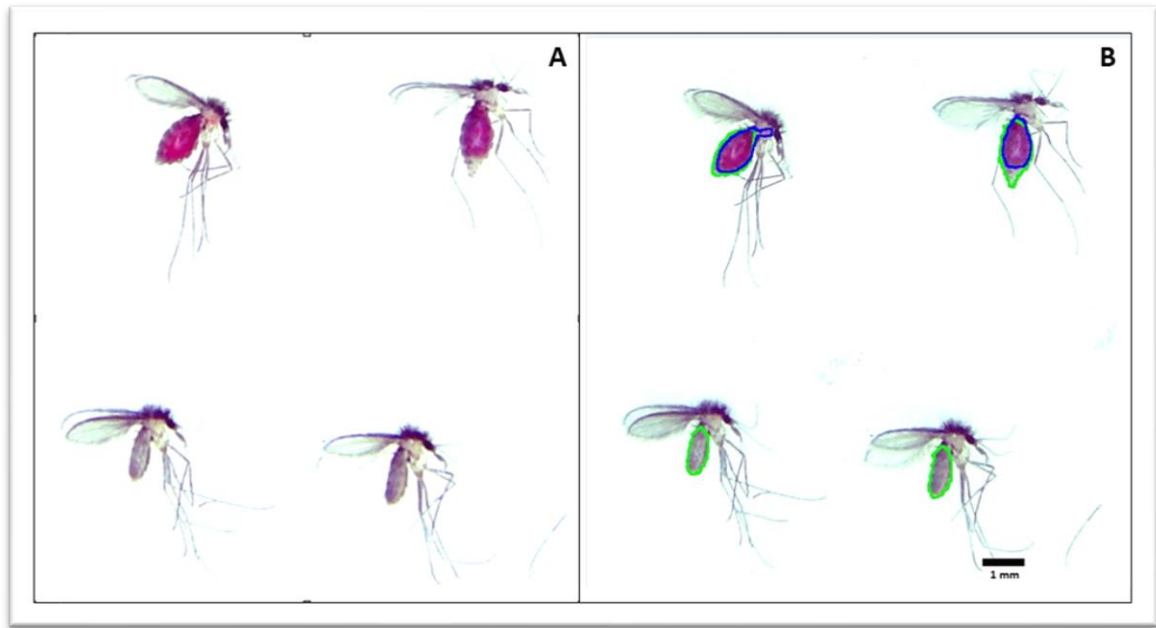


Figura 15: Imagem de quatro fêmeas de flebotomíneos após o teste da alimentação *in vivo* (grupo H). (A) Fêmeas 1, 2, 3 e 4. Fêmeas 1 e 2 estão ingurgitadas, sendo que a fêmea 1 apresenta sangue preenchendo praticamente toda a área do abdômen e parte do tórax, enquanto o sangue ocupa apenas parte do abdômen da fêmea 2, e as fêmeas 3 e 4, aparentemente não se alimentaram. (B) A mesma imagem anterior, mas com os traçados do contorno do abdômen (M-AB) em verde e do contorno da região vermelha (MS) no corpo do inseto em azul.

Uma vez que, os insetos do grupo Branco, não tiveram contato com a fonte de alimentação, não foi possível detectar a presença de região/área vermelha no abdômen ($MS = 0 \text{ mm}^2$). No caso dos insetos que tiveram contato com as fontes de alimentação, as áreas vermelhas eram facilmente detectáveis/mensuráveis pelo método de processamento de imagem utilizado ($MS > 0 \text{ mm}^2$). Este critério passou a ser empregado para separar os insetos alimentados (AL) ($MS > 0 \text{ mm}^2$) dos não alimentados (NAL) ($MS = 0$).

Como os insetos analisados foram fotografados em decúbito lateral, as partes mais claras entre as placas tergais e esternais do abdômen “ornamentam” o contorno abdominal com uma sequência repetitiva de regiões claras e escuras formando uma linha tracejada. Tal característica interferiu no protocolo utilizado para gerar a M-AB, produzindo uma linha de contorno do abdômen irregular (Figura 16). Uma vez que, constatado que o formato do abdômen dos insetos AL e NAL ajusta-se muito bem ao de uma elipse (Figura 16). Foi incluído nas análises de imagem o recurso *Fit Ellipse*. Este recurso ajusta a uma determinada forma/objeto selecionado, no caso a M-AB, uma elipse com mesma área da forma/objeto selecionado. O *Fit Ellipse* melhora a precisão do contorno do abdômen, acabando com a irregularidade do traçado das M-ABs (*edit + selection + fit ellipse*).

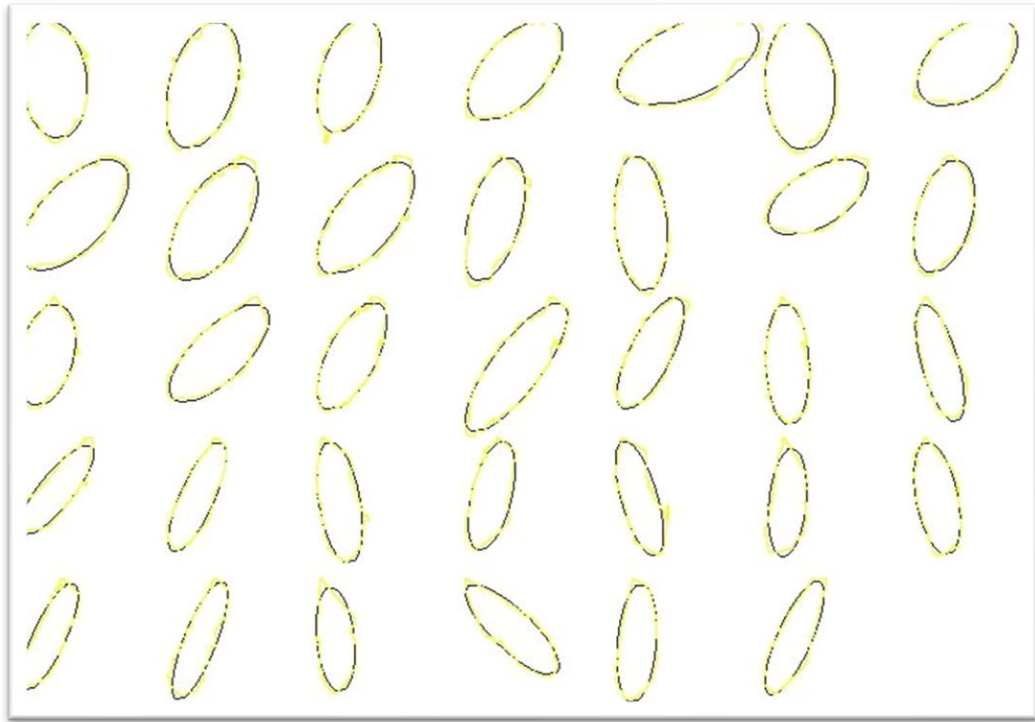


Figura 16: Comparação da forma do contorno irregular do abdômen de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após o teste de alimentação pelo traçado da M-AB (amarelo) com o traçado obtido após a aplicação o recurso *Fit Ellipse* (preto).

Além disso, ao incluir o parâmetro *Fit Ellipse* para a análise das M-AB foram geradas algumas informações adicionais, entre elas, o comprimento do diâmetro maior = estimativa do comprimento do abdômen (*Major*) e do menor = estimativa da largura do abdômen (*Minor*) da elipse “ajustada”, fornecendo assim uma boa estimativa do comprimento e da largura do abdômen do inseto, respectivamente (Figura 17).

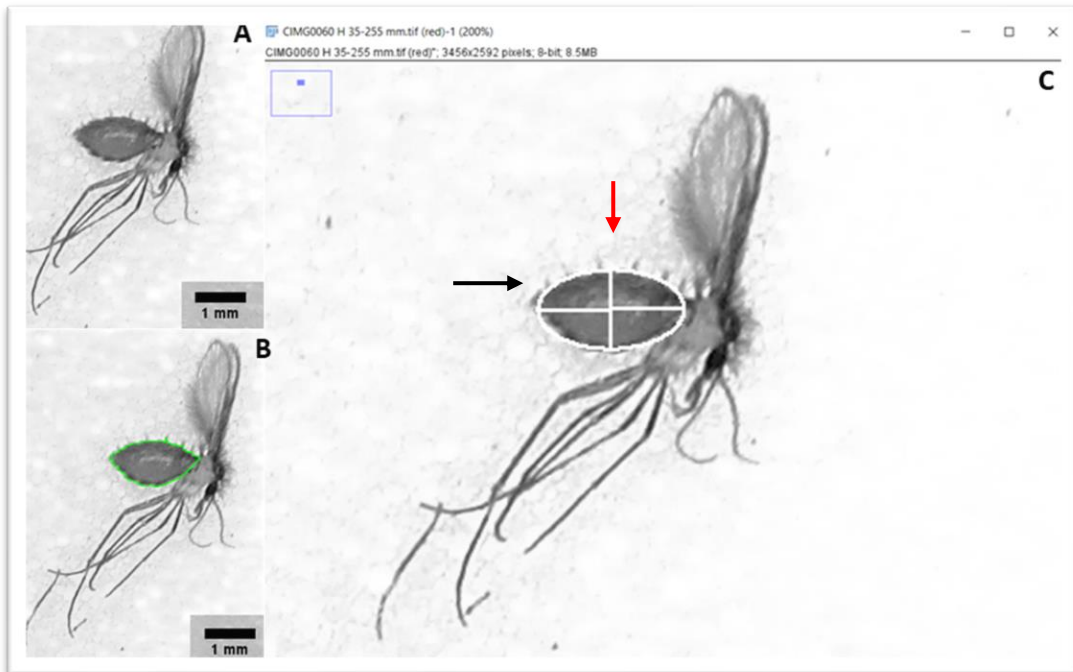


Figura 17: Estimativa do comprimento e a largura do abdômen das fêmeas de flebotomíneos gerado pelo recurso *fit ellipse*. (A) Imagem de uma fêmea ingurgitada. (B) A Fêmea da imagem anterior com o traçado da M-AB em verde (C) O traçado da elipse ajustada gerada pela aplicação do recurso *fit ellipse* na M-AB em branco, destacando diâmetro maior (*Major*) e diâmetro menor (*Minor*). Legenda: A seta preta indica o diâmetro maior e a seta vermelha indica o diâmetro menor.

Assim, inicialmente foram utilizados três parâmetros extraídos a partir da análise de imagem (área, comprimento e largura) par a caracterizar o crescimento do tamanho do abdômen das fêmeas decorrente do repasto sanguíneo. Quando se comparou a área, comprimento e largura do abdômen das fêmeas AL e NAL após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*) com as fêmeas do grupo B, observou-se que a média destes três parâmetros foi maior nos insetos AL do que nos B e NAL (Tukey, $p < 0,05$) (Figura 18).

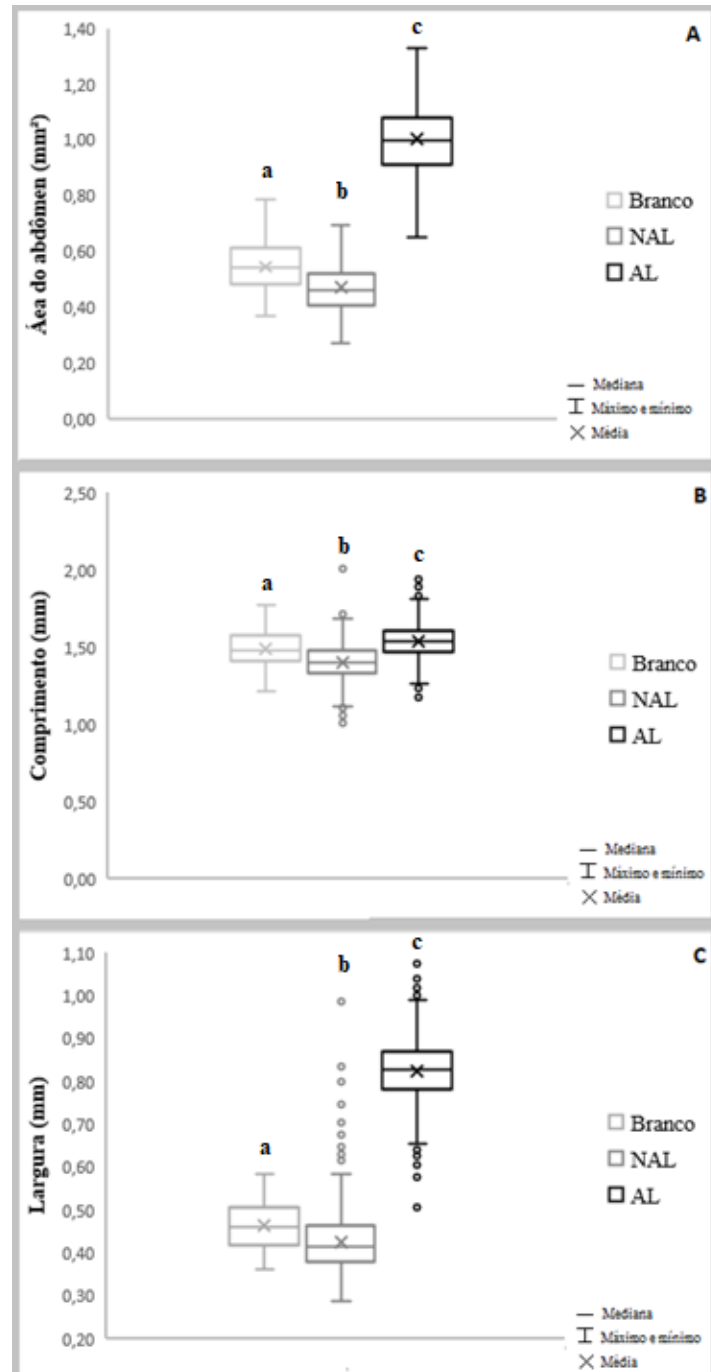


Figura 18: Comparação da área (mm²), Comprimento (mm) e largura (mm) do abdômen de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em jejum [B (n=97)], alimentadas [AL (n=969)] ou não alimentadas [NAL (n=730)] após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*). Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (Tukey, $p < 0,05$). A separação dos insetos NAL e AL foi realizada pela ausência (MS=0) ou presença (MS>0 mm²) de região/área vermelha detectável no corpo dos insetos.

Como no grupo NAL (MS=0) foi possível observar no “*box plot*” (Figura 18) uma maior quantidade de valores atípicos do que no grupo Branco (B), optou-se em utilizar os valores do grupo B para o cálculo do ponto de corte/limiar (média somada + 2 desvios padrão) (Tabela 2).

Na tabela abaixo, estes valores de corte foram utilizados na categorização dos insetos como NAL ou AL após os testes de alimentação.

Tabela 2: Valores médios e do limiar da área (mm²), comprimento (mm) e largura (mm) do abdômen das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* dos grupos B, AL e NAL após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*). A separação dos insetos NAL e AL foi realizada pela ausência (MS = 0) ou presença (MS > 0 mm²) de região/área vermelha detectável no corpo dos insetos.

Parâmetro/grupo	Alimentados (média ±dp)	Branco (média ±dp)	Não Alimentados (média ±dp)	Resumo estatístico	Ponto de corte
Área (mm ²)	1,00 ± 0,13	0,55 ± 0,09	0,47 ± 0,10	AL>B>NAL	0,73
Comprimento (mm)	1,54 ± 0,11	1,49 ± 0,13	1,40 ± 0,11	AL>B>NAL	1,75
Largura (mm)	0,83 ± 0,07	0,47 ± 0,06	0,42 ± 0,06	AL>B>NAL	0,59

Quando foi comparada a variação da área do abdômen, do comprimento e da largura dos insetos (Figura 19), observou-se uma correlação muito maior entre área com a largura ($R^2=0,96$) do que entre a área e o comprimento ($R^2=0,51$). Quando comparados os grupos Branco e AL, foi possível observar um aumento médio maior da largura (76,6%) do que do comprimento (3,4%), o que explicaria a maior correlação entre a largura com o aumento da área abdominal das fêmeas em decorrência do repasto sanguíneo.

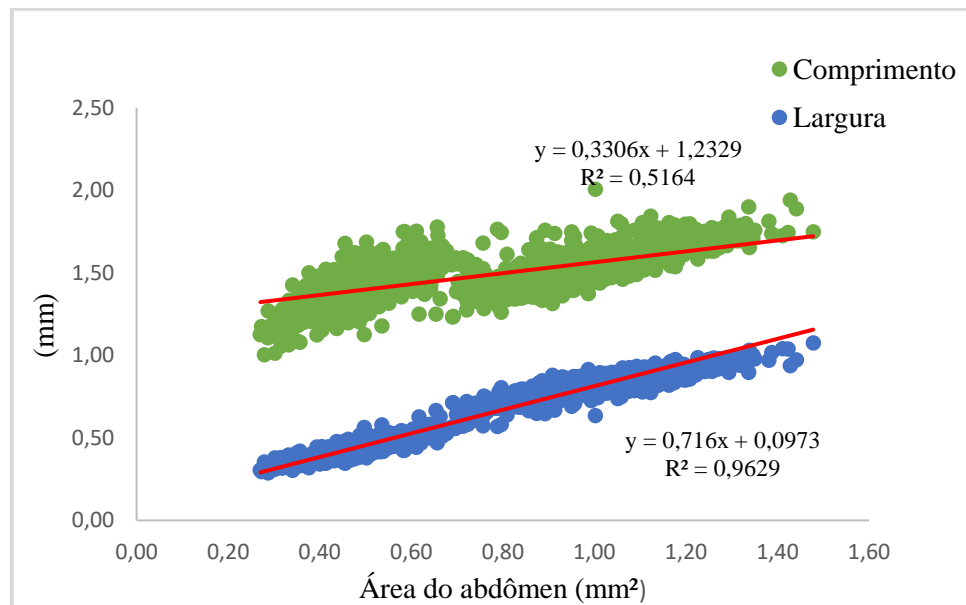


Figura 19: Variação do comprimento e da largura (mm) em função da área do abdômen dos insetos Não Alimentados (n= 730) com os Alimentados (n=969) após contato com a fonte de sangue. Enquanto o comprimento apresenta menor correlação ($R^2= 0,51$), a largura nitidamente apresenta uma alta correlação com a área do abdômen ($R^2= 0,96$).

5.2 Comparação da metodologia de análise de imagem com a metodologia de dosagem de hemoglobina para avaliar o repasto dos insetos após os testes de alimentação (*in vitro* e *in vivo*)

Inicialmente foi feita uma comparação qualitativa entre a análise de imagem e a dosagem de hemoglobina, sendo comparadas as capacidades das duas técnicas em classificar as fêmeas em AL e NAL. Para isso, foram usadas as 1053 fêmeas que foram inclusas tanto nas análises de imagem, quanto na dosagem de hemoglobina (Tabela 1). Os critérios para separação nas análises baseadas nas dimensões do abdômen dos insetos foram área, comprimento, largura e presença/ausência da MS. No caso da dosagem de hemoglobina, o critério para separação das fêmeas em AL e NAL baseou-se no valor da absorbância obtido após o desconto do valor médio apresentado pelo grupo B. Ou seja, as fêmeas que apresentaram um valor inferior à média do grupo B foram classificadas como NAL, e as que apresentaram um valor superior à média do valor de B foram classificadas como AL.

O primeiro aspecto que chamou atenção na observação dos dados mostrados na tabela abaixo (Tabela 3) foi a baixa capacidade do parâmetro comprimento na caracterização das fêmeas em AL e NAL, categorizando apenas 18 fêmeas como AL, o que representou apenas 3,1% da média dos demais critérios avaliados ($578,5 \pm 14,3$). Este achado, associado ao pequeno aumento médio do comprimento do abdômen (~ 3%) entre os grupos B, AL e NAL (Figura 17), sugere que quando acontece, o aumento do comprimento abdominal quase não interfere na capacidade das fêmeas de acomodar o sangue ingerido no intestino médio abdominal. Já os outros três critérios provenientes da análise de imagem (área, largura e MS) apresentaram resultado muito parecido na comparação qualitativa com a dosagem de hemoglobina, com a porcentagem de convergência variando entre 93,5-94,6%.

Tabela 3: Comparação do número de insetos categorizados como AL e NAL entre as metodologias baseadas na análise de imagem e dosagem de hemoglobina a partir de 1053 fêmeas avaliadas após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*).

Critério*	Alimentados	Não Alimentados	Convergência	Divergência	% convergência
Dosagem de hemoglobina	607	446	–	–	–
Máscara Sangue (MS)	568	485	996	57	94,59
Área (mm²)	563	490	985	68	93,54
Comprimento (mm)	18	1035	462	591	43,87
Largura (mm)	576	477	990	63	94,02

*Critérios utilizados para separação das fêmeas em AL e NAL: Dosagem de hemoglobina (volume estimado de sangue > 0mm³); Máscara Sangue (MS >0); Área (>0,73 mm²); Comprimento (> 1,75 mm), Largura (> 0,69 mm).

Vários fatores podem explicar essa divergência de ~5-6% encontrada na capacidade das duas técnicas analisadas de caracterizar os insetos em AL e NAL. Entre eles, estão problemas metodológicos, como erros de pipetagem, na maceração dos insetos ou na obtenção da M-AB. Entretanto, devemos considerar que variações no tamanho corporal dos insetos do grupo B podem impactar tanto nas análises de imagem, sobretudo naquelas baseadas nas dimensões do abdômen, como na dosagem de hemoglobina, devido a variação na quantidade do volume de tecidos do inseto processados em conjunto com o sangue ingerido por eles. As 97 fêmeas do grupo B, pertencentes a 3 gerações distintas, tiveram a dosagem de hemoglobina (absorbância) à 540nm registrada (0,0478-0,1630 mm³). Quando se aplicou a leitura obtida destas fêmeas na equação de regressão linear obtida pelo valor de absorbância (sem descontar a média dos brancos) com o volume de sangue estimado (mm³), 607 fêmeas foram classificadas como AL. Foram obtidos valores positivos em 4 amostras (0,083 a 0,276 mm³) de insetos NAL, ou seja, 4,12% (4/75) foram categorizados como insetos AL (Figura 20). Assim, foi possível inferir que a convergência encontrada entre, a análise de imagem desenvolvida no presente estudo com a metodologia de dosagem de hemoglobina, para separar os insetos AL dos NAL após os testes de alimentação foi bastante satisfatória.

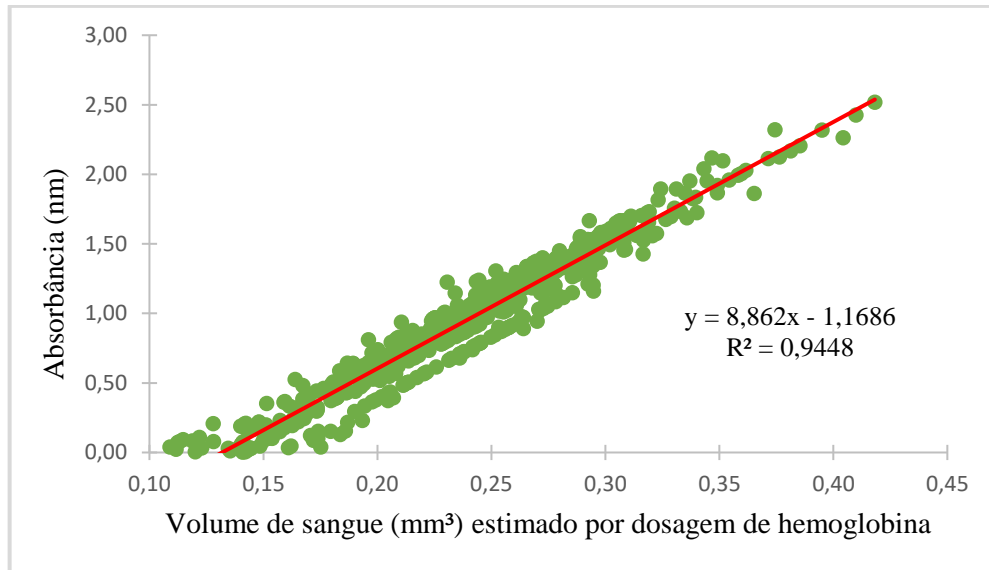


Figura 20: Equação de regressão linear da variação dos valores de absorbância (540 nm) antes da subtração do branco em função do volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina. Os dados são relativos a 607 fêmeas categorizadas como alimentadas pela dosagem de hemoglobina após os testes de alimentação (*in vivo* e *in vitro*).

Além de diferenças no tamanho corporal observou-se também alguns “fenótipos” diferentes relacionado ao aspecto do repasto apresentados por poucas fêmeas (Figura 21).

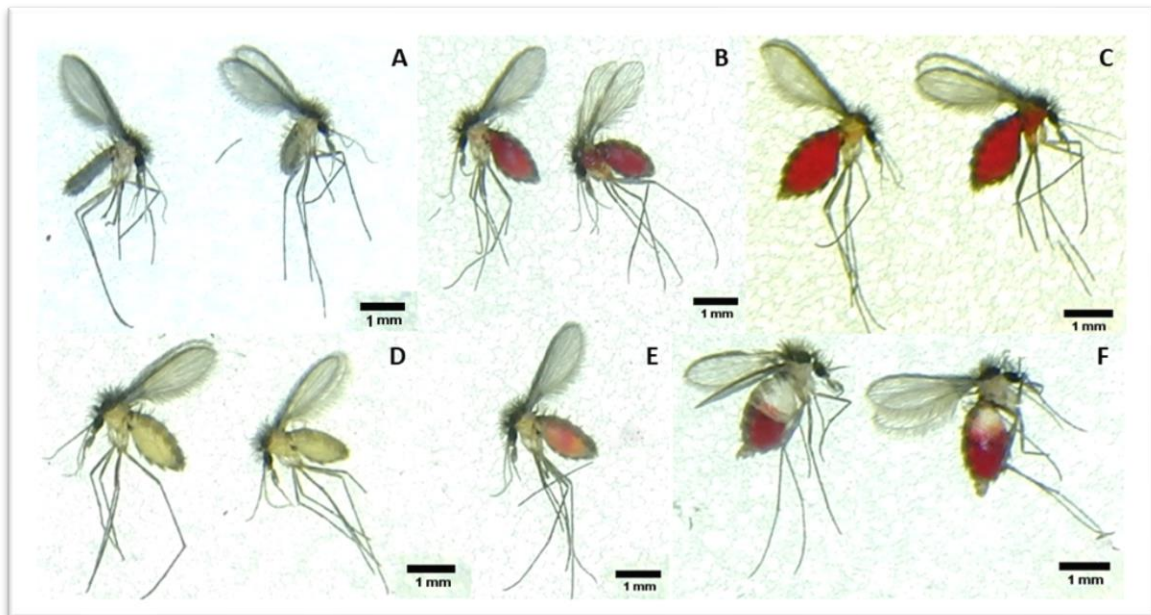


Figura 21: Variação do tamanho corporal e dilatação do abdômen e coloração do tórax-abdômen das fêmeas de flebotomíneo observados antes e após os ensaios de alimentação. (A) Variação do tamanho corporal de fêmeas em jejum (B) Fêmeas completamente ingurgitadas com sangue, a fêmea da direita apresenta coloração vermelha na região torácica além da abdominal (C) Fêmeas completamente ingurgitadas com sangue de *hamster*, a fêmea da direita apresenta coloração vermelha (mais brilhante) na região torácica e abdominal (D) Fêmeas ingurgitadas com líquido de coloração clara (E) Fêmea ingurgitada com líquido de cor laranja (F) Fêmeas com abdômen dividido em coloração clara e vermelha.

Entre estes “fenótipos” diferentes, foram apresentados por 17 fêmeas que aparentemente se alimentaram, *in vitro*, apenas de plasma (abdômen claro). Estas 17 fêmeas não foram incluídas na análise anterior, pois elas não foram categorizadas como alimentadas, nem pela dosagem de hemoglobina nem pela detecção de área/região vermelha no corpo (Tabela 4). Estes insetos só puderam ser considerados alimentados por critérios que avaliam parâmetros do tamanho do abdômen (área e largura). A largura do abdômen foi mais sensível para categorizar como alimentados os insetos que ingeriram “plasma”, pois dos 17 flebotomíneos avaliados, 15 (88,2%) seriam considerados alimentados por este critério, contra apenas 11 (64,7%) considerando área abdominal.

Tabela 4: Caracterização de fêmeas de flebotomíneos entre alimentadas (AL) e não alimentadas (NA) utilizando quatro critérios distintos [dosagem de hemoglobina, área vermelha (MS), área do abdômen (M-AB) e largura do abdômen]. As 17 fêmeas avaliadas foram aquelas que apresentaram o “fenótipo” abdômen claro (AP) após contato com a fonte de alimentação *in vitro*.

Inseto	Dosagem de hemoglobina (AL¹, NA²)	Área vermelha (mm²) (AL, NA²)	Área AB (mm²) (AL¹, NA²)	Largura (mm) (AL¹, NA²)
144	-0,35 (-)	0 (-)	0,80 (+)	0,71 (+)
145	-0,60 (-)	0 (-)	0,70 (-)	0,69 (+)
146	-0,13 (-)	0 (-)	0,86 (+)	0,68 (+)
147	-0,41 (-)	0 (-)	0,73 (-)	0,63 (+)
148	-0,07 (-)	0 (-)	0,98 (+)	0,64 (+)
190	-0,24 (-)	0 (-)	0,72 (-)	0,59 (+)
454	-0,35 (-)	0 (-)	0,83 (+)	0,64 (+)
949	-0,43 (-)	0 (-)	0,83 (+)	0,76 (+)
992	-0,18 (-)	0 (-)	0,87 (+)	0,73 (+)
993	-0,42 (-)	0 (-)	0,75 (+)	0,65 (+)
994	-0,43 (-)	0 (-)	0,59 (-)	0,63 (+)
995	-0,05 (-)	0 (-)	0,77 (+)	0,68 (+)
996	-0,41 (-)	0 (-)	0,57 (-)	0,54 (-)
1034	-0,36 (-)	0 (-)	0,96 (+)	0,76 (+)
1706	-	0 (-)	0,99 (+)	0,80 (+)
1707	-	0 (-)	1,23 (+)	0,99 (+)
1770	-	0 (-)	0,64 (-)	0,57 (-)

*Critério de separação de insetos AL dos NAL: Dosagem de hemoglobina (Dosagem de hemoglobina >0mm³); Área vermelha (MS>0mm²); Área AB (>0,73mm²), Largura AB (>0,69mm).

Para a comparação quantitativa entre a dosagem de hemoglobina e a análise de imagem, foram utilizadas as mesmas 1053 fêmeas da análise qualitativa. Para tal, se comparou como os parâmetros de alimentação observados na análise de imagem variavam em função do volume de sangue (mm³) estimado pela dosagem de hemoglobina. Através da análise dos gráficos da Figura 22 é possível observar uma alta correlação entre a dosagem de hemoglobina e os

parâmetros área (M-AB e elipse ajustada) ($R^2=0,85$) e largura ($R^2=0,83$) abdominal. No entanto, a comparação da dosagem de hemoglobina com o comprimento abdominal e a MS, apresentou baixa correlação ($R^2=0,39$).

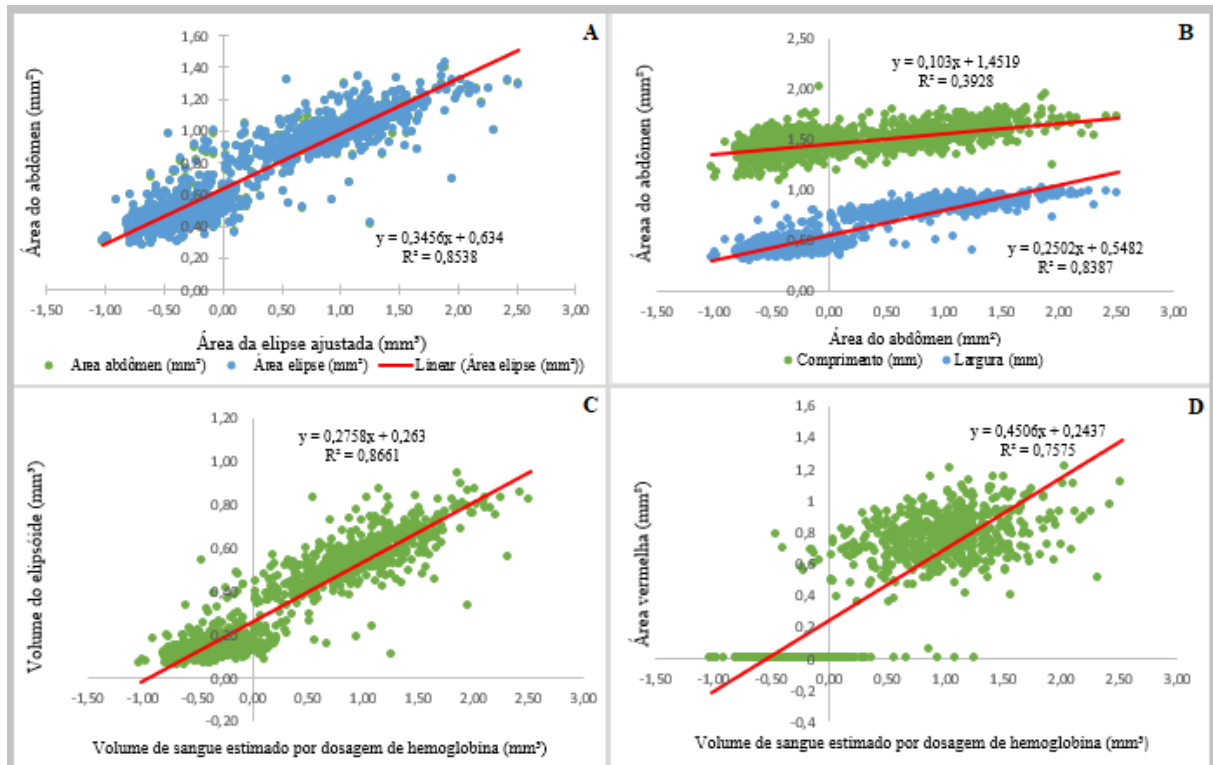


Figura 22: Equações de regressão linear das variações de parâmetros provenientes do processamento de imagens utilizados para a avaliação do repasto sanguíneo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em função do volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina. (A) Área do abdômen (M-AB) e da elipse ajustada (*fit ellipse*). (B) Comprimento e largura do abdômen. (C) Área vermelha (MS). (D) O volume do elipsoide gerado a partir da elipse ajustada ao contorno do abdômen dos insetos (M-AB). Os dados são relativos a 1053 fêmeas eutanasiadas após os testes de alimentação. O volume do elipsoide foi calculado pela fórmula $4/3\pi abc$ a partir dos dados do diâmetro maior (a) e do diâmetro menor (b) gerados pelo ajuste “*fit ellipse*” da M-AB e considerando que $b=c$ (esferoide em forma de charuto). Os dados foram ajustados por regressão linear simples (reta) e foi adicionado ao gráfico a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) de cada ajuste realizado.

O abdômen dos flebotomíneos se assemelha a um elipsoide do tipo charuto, isso acontece quando o esferoide possui o diâmetro b (largura) igual ao diâmetro c (altura). Quando o volume do elipsoide ajustado ao abdômen dos insetos (ver a legenda da figura acima) foi comparado ao volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina, foi observada uma alta correlação ($R^2=0,87$), levemente superior a correlação obtida a partir da comparação da área do abdômen com o volume do elipsóide. Entretanto, o volume do elipsóide estimado pela análise de imagem foi quase sempre menor do que o volume estimado por dosagem de hemoglobina, e esta diferença foi diretamente proporcional ($R^2=0,98$) ao aumento do volume

de sangue ingerido pelos insetos (Figura 23). Esta diferença observada pode ser explicada pelo fenômeno da pré-diurese, que ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneo.

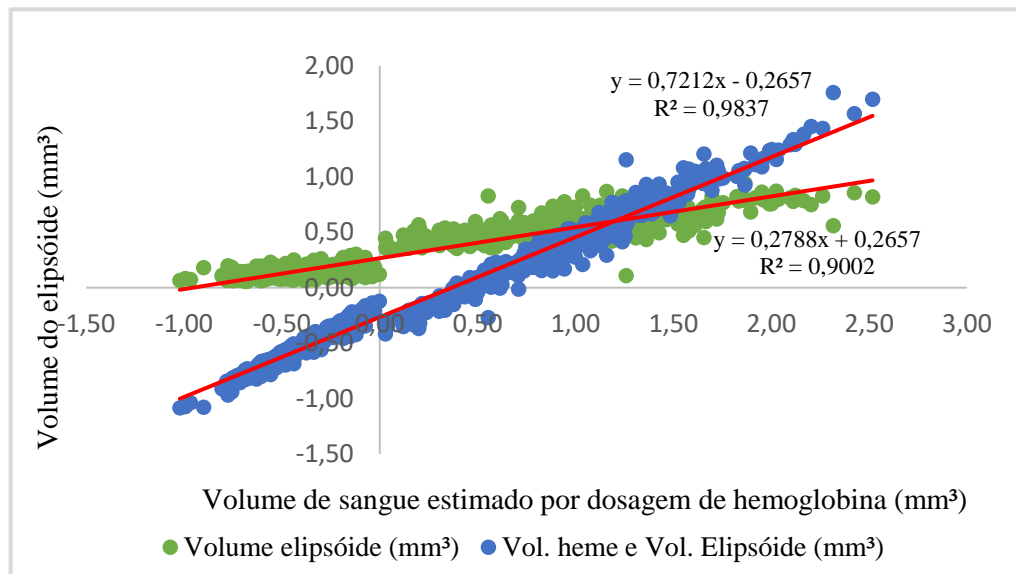


Figura 23: Equação de regressão linear da variação do volume do elipsoide e da diferença Heme-Elipsoide em função do volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina. Os dados são relativos a 985 fêmeas eutanasiadas após os testes de alimentação. A diferença Heme-Elipsoide foi obtida pela subtração do valor volume de sangue estimado pela dosagem de hemoglobina do valor do volume estimado da área do abdômen dos flebotomíneos (elipsoide). O volume do elipsoide foi calculado pela fórmula $\frac{4}{3}\pi abc$ a partir dos dados do diâmetro maior (a) e do diâmetro menor (b) gerados pelo ajuste “fit ellipse” da M-AB e considerando que $b=c$ (esferoide em forma de charuto). As 985 fêmeas incluídas nesta análise foram aquelas do universo de 1053 avaliadas tanto pelo parâmetro área do abdômen (M-AB) como pela dosagem de hemoglobina que apresentaram convergência entre estas duas metodologias na avaliação qualitativas dos insetos após alimentação (Tabela 1). Os dados foram ajustados por regressão linear simples (reta) e foi adicionado ao gráfico a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) de cada ajuste realizado.

5.3 Avaliação do uso da membrana Parafilm® M tratada com Plasma gel para a alimentação sanguínea *in vitro* de *Lutzomyia longipalpis* em laboratório

Foi avaliada a influência da idade pós emergência das fêmeas e a utilização da membrana Parafilm® M tratada com Plasma gel na alimentação sanguínea *in vitro*, de forma comparada a alimentação *in vivo*. Durante as análises do repasto sanguíneo, foram utilizados dois parâmetros: i) a proporção de fêmeas que se alimentaram; e ii) o tamanho do repasto sanguíneo. Estes dois parâmetros foram obtidos utilizando a dosagem de hemoglobina (teste bioquímico) e a área do abdômen (análise de imagem). Foram incluídas nestas análises, 1889 fêmeas, sendo que destas, 1053 foram avaliadas pelas duas metodologias (correspondendo as fêmeas de 4 e 5 dias pós emergência) e 643 foram avaliadas apenas pela área do abdômen (correspondendo as fêmeas de 3 e 6 dias pós emergência).

5.3.1 Influência da idade pós emergência dos insetos adultos no tamanho do repasto sanguíneo dos flebotomíneos

Ao se comparar as áreas do abdômen mensurados pela análise de imagem das fêmeas alimentadas com 3, 4, 5 e 6 dias pós emergência, ficou evidente que quanto maior a idade pós emergência, maior a área abdominal daquelas que se alimentaram. Em ordem decrescente, a média abdominal das fêmeas de flebotomíneo que realizaram o repasto sanguíneo por dias de vida foi 3[1,09 ± 0,13 mm² (n=129)] >4[1,04 ± 0,14 mm² (n=122)]>5 [1,00 ± 0,13 mm² (n=447)] > 6 [0,95 ± 0,10 mm² (n=271)] dias pós emergência (Tukey p<0,05). Um resultado semelhante foi obtido quando se comparou o volume de sangue estimado por dosagem de hemoglobina. O volume de sangue estimado após o ensaio de alimentação foi maior nas fêmeas de 4 dias (1,11 ± 0,44 mm³) do que nas de 5 dias pós emergência (0,98 ± 0,45 mm³) (Tukey p<0,05) (Figura 24).

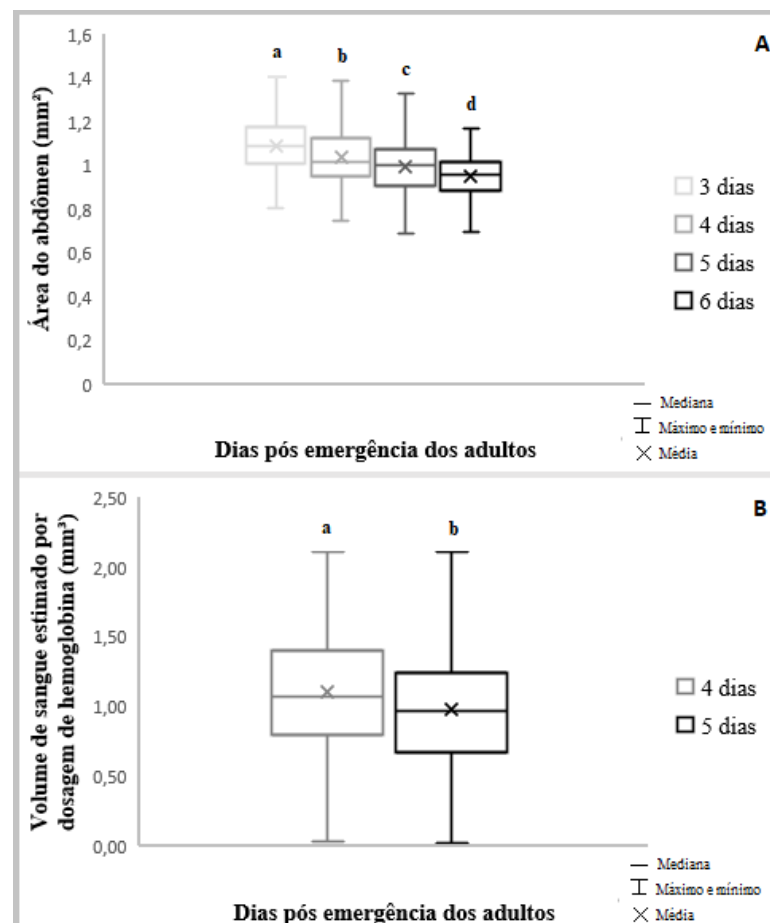


Figura 24: Comparação do tamanho do repasto sanguíneo por idade pós emergência das fêmeas estimado: (A) Área do abdômen - A separação dos insetos NAL e AL foi realizada pela ausência (MS=0) ou presença (MS>0 mm²) de região/área vermelha detectável no corpo dos insetos; (B) Dosagem de hemoglobina - A separação dos insetos NAL e AL foi realizada a partir do desconto do valor da absorbância dos insetos do grupo B. Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (Tukey, p<0,05).

Quando se comparou o tamanho do repasto sanguíneo entre os grupos experimentais por idade pós emergência das fêmeas, através do parâmetro área do abdômen (análise de imagem), observou-se que no geral os grupos apresentaram áreas semelhantes. Ao se comparar os grupos experimentais de 3 dias pós emergência, foi observado que o grupo Controle positivo (C+) ($1,04 \pm 0,13 \text{ mm}^2$) apresentou uma área abdominal menor do que os grupos *Hamster* (H) ($1,13 \pm 0,12 \text{ mm}^2$) e Plasma Gel (PG) ($1,10 \pm 0,13 \text{ mm}^2$) (Tukey $p < 0,05$). Todos os grupos experimentais com 4 dias pós emergência apresentaram área abdominal semelhante (Tukey $p > 0,05$). No caso dos grupos com 5 dias pós emergência, o grupo C+ ($0,93 \pm 0,11 \text{ mm}^2$) apresentou uma área menor do que os grupos Controle negativo (C-) ($1,00 \pm 0,15 \text{ mm}^2$) H ($1,04 \pm 0,14 \text{ mm}^2$) e PG ($1,04 \pm 0,11 \text{ mm}^2$) (Tukey $p < 0,05$). Em relação aos grupos 6 dias pós emergência, o grupo C+ ($0,91 \pm 0,10 \text{ mm}^2$) apresentou uma área menor do que dos grupos H ($0,90 \pm 0,10 \text{ mm}^2$) e PG ($0,95 \pm 0,10 \text{ mm}^2$) e estes dois grupos foram diferentes entre eles, sendo o grupo PG o que apresentou maior área abdominal (Tukey $p < 0,05$).

Quando a comparação entre os grupos experimentais foi feita a partir do volume de sangue ingerido mensurado por dosagem de hemoglobina, o volume médio estimado de sangue das fêmeas de 4 dias pós emergência também foi semelhante entre os grupos experimentais (Tukey $p > 0,05$), e nos grupos de 5 dias pós emergência, apenas o grupo C- apresentou um volume de sangue menor do que os demais grupos experimentais (Tukey $p < 0,05$) (Figura 25; Tabela 5).

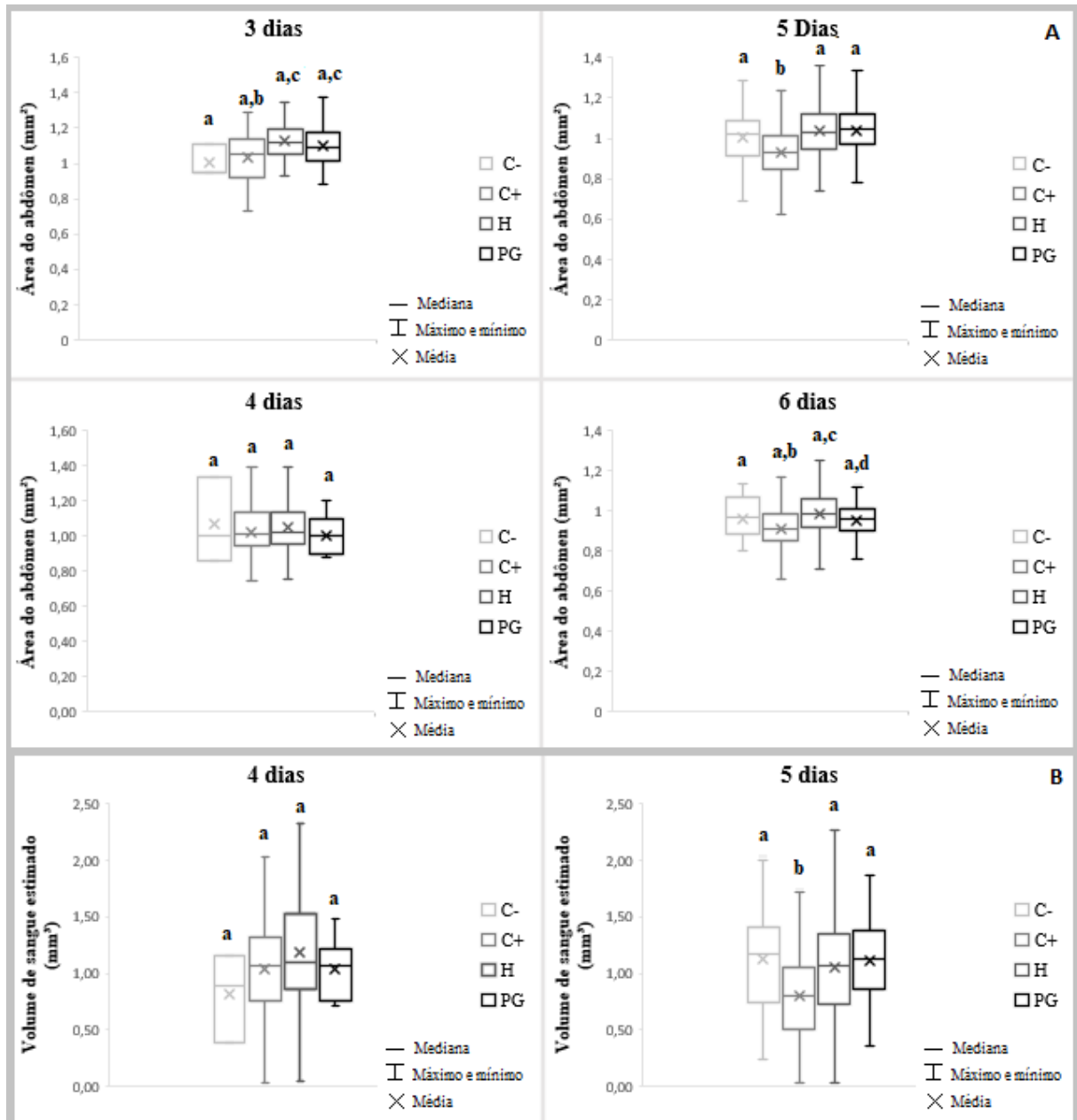


Figura 25: Comparação do tamanho do repasto sanguíneo entre os grupos experimentais [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H)], por idade pós emergência dos insetos adultos estimado: (A) Área do abdômen (mm²) estimada por análise de imagem; (B) Volume de sangue (mm³) estimado por dosagem de hemoglobina. Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (Tukey, $p < 0,05$).

Ao se comparar o tamanho do repasto sanguíneo estimado por análise de imagem (área do abdômen), dentro de cada grupo experimental, por idade pós emergência, os resultados obtidos foram bastante semelhantes. O grupo C- não apresentou diferença na área do abdômen relacionada a idade das fêmeas (Tukey $p > 0,05$). As principais diferenças encontradas foram na comparação entre os dois primeiros dias pós emergência (3 e 4) com os dois últimos dias (5 e 6), como observado nos grupos C+, H e PG (Tukey $p < 0,05$) (Figura 26; Tabela 5).

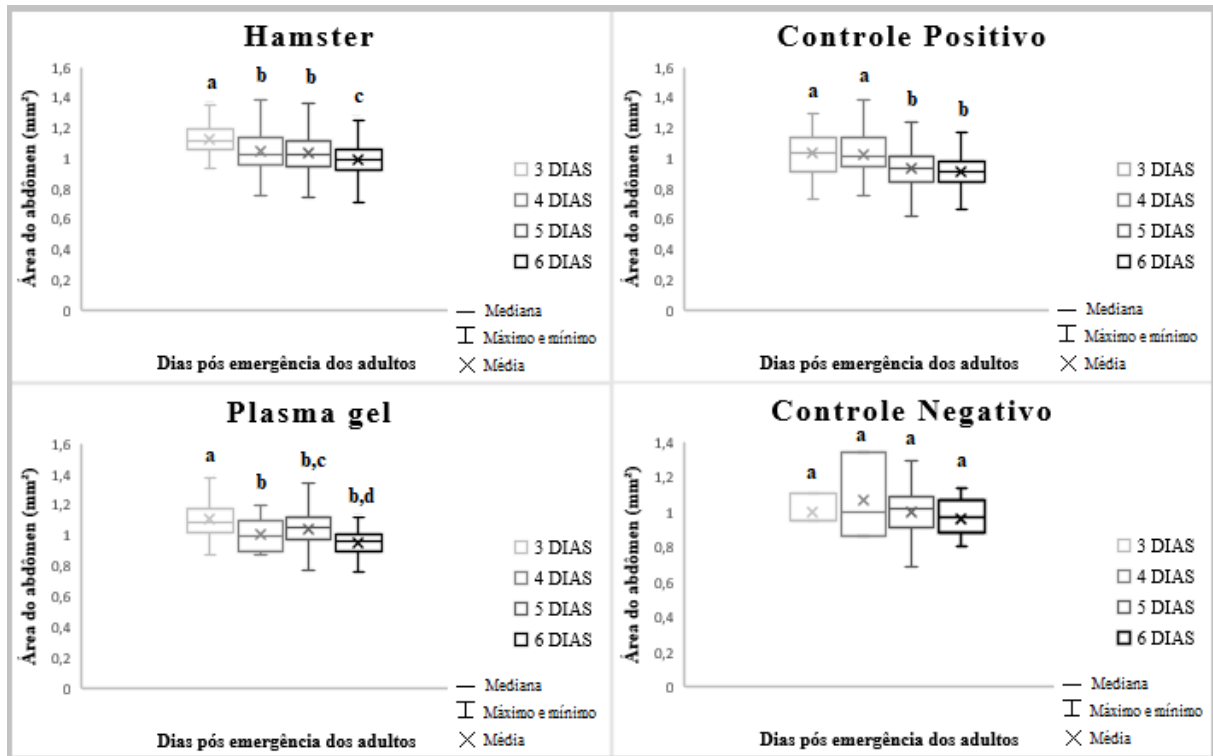


Figura 26: Comparação do tamanho do repasto sanguíneo dentro de cada grupo experimental [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H), por idade pós emergência dos insetos adultos estimado pela área do abdômen. Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (Tukey, $p < 0,05$). A separação dos insetos NAL e AL foi realizada pela ausência ($MS=0$) ou presença ($MS > 0 \text{ mm}^2$) de região/área vermelha detectável no corpo dos insetos.

Tabela 5: Resumo dos resultados dos grupos experimentais [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H)] obtidos através da análise do tamanho do repasto sanguíneo (AL) por idade pós emergência dos insetos adultos, estimado por análise de imagem [área do abdômen (mm^2)] e dosagem de hemoglobina (mm^3).

Grupo experimental (n)	Dias pós emergência das fêmeas							
	3	4	5	6	(3-6)	4	5	(4-5)
	Análise de imagem (Área do abdômen - mm^2)				Dosagem de hemoglobina (Volume de sangue - mm^3)			
PG (384)	$1,10 \pm 0,13$ (29)	$1,00 \pm 0,11$ (11)	$1,04 \pm 0,11$ (93)	$0,95 \pm 0,08$ (88)	Média/ grupo 1,02	$0,81 \pm 0,39$ (11)	$1,13 \pm 0,48$ (93)	1,07
C- (444)	$1,00 \pm 0,09$ (3)	$1,07 \pm 0,25$ (3)	$1,00 \pm 0,15$ (33)	$0,96 \pm 0,13$ (24)	1,00	$1,04 \pm 0,44$ (3)	$0,79 \pm 0,38$ (33)	0,97
C+ (453)	$1,04 \pm 0,13$ (43)	$1,03 \pm 0,13$ (46)	$0,93 \pm 0,11$ (161)	$0,91 \pm 0,10$ (82)	0,98	$1,18 \pm 0,46$ (46)	$1,05 \pm 0,49$ (161)	0,92
H (418)	$1,13 \pm 0,12$ (54)	$1,05 \pm 0,16$ (62)	$1,04 \pm 0,14$ (167)	$0,99 \pm 0,10$ (77)	1,05	$1,03 \pm 0,25$ (62)	$1,11 \pm 0,34$ (167)	1,12
Média (♀s/dia)	1,09	1,04	1,00	0,95	1,01	1,11	0,98	1,05

5.3.2 Influência da idade pós emergência dos insetos adultos na porcentagem de flebotomíneos alimentados

Durante os 5 ensaios experimentais realizados, foram avaliados um total de 1899 insetos, sendo que destes 969 se alimentaram, perfazendo um total de 57,03% insetos alimentados. A porcentagem média de fêmeas alimentadas aumentou em conjunto com o aumento da idade pós emergência, sendo a porcentagem de fêmeas alimentadas com 3 e 4 dias menor do que a porcentagem de fêmeas alimentadas com 5 e 6 dias (Qui-quadrado $p < 0,05$) (Figura 27).

Quando a porcentagem de alimentados por idade pós emergência dos adultos foi comparada, foram observadas diferenças entre as fêmeas mais jovem (3 e 4 dias) com as mais velhas (5 e 6 dias) (Qui-quadrado $p < 0,05$). Esses dados sugerem que à medida que o tempo de vida dos insetos aumenta, a quantidade de insetos alimentados também aumenta, sendo menores em 3 e 4 dias pós emergência e maiores em insetos com 5 e 6 dias pós emergência (Figura 27). Porém quando se comparou a porcentagem de flebotomíneos alimentados entre os grupos experimentais (C+, C-, PG e H) pela idade pós emergência dos insetos adultos, estimada através da área do abdômen (mm^2) mensurada por análise imagem, a diferença foi nítida entre os grupos. A porcentagem dos insetos alimentados obtida com todas as 4 idades das fêmeas avaliadas em ordem decrescente foi H (82,95%) > C+ (69,14%) > PG (51,36%) > C- (12,93%) (Qui-quadrado $p < 0,05$), com apenas duas exceções, uma com fêmeas de 4 dias pós emergência (entre PG e C+) e outra com fêmeas de 6 dias pós emergência (entre C+ e H) (Tabela 6).

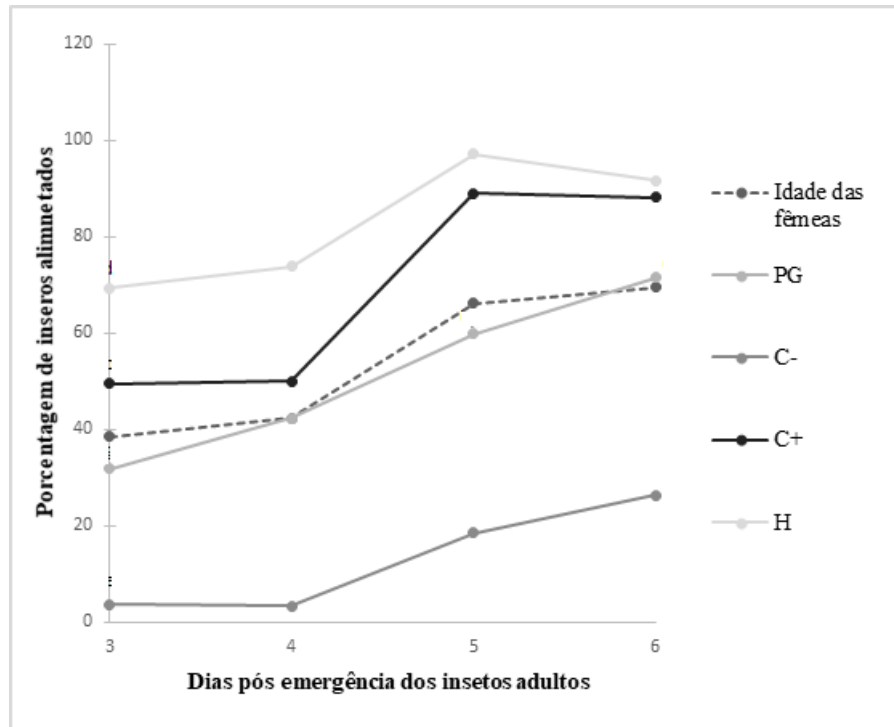


Figura 27: Porcentagem de fêmeas alimentadas por grupo experimental estimada a partir da área abdominal (mm^2) mensurada por análise de imagem [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H)], por idade pós emergência dos insetos adultos. A linha tracejada representa a porcentagem média de todas as fêmeas alimentadas por idade pós emergência.

Tabela 6: Resumo dos resultados dos grupos [Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Plasma gel (PG); *Hamster* (H)] da porcentagem de insetos alimentados (AL), por idade pós emergência dos insetos adultos, avaliado pela área do abdômen e pela dosagem de hemoglobina.

Grupo experimental (n)	Dias pós emergência dos insetos adultos				
	3	4	5	6	(3-6)
	Análise de imagem (Área do abdômen - mm^2)				
	% (N° Alimentados)	% (N° Alimentados)	% (N° Alimentados)	% (N° Alimentados)	% Média
PG (384)	31,87 (29)	42,31 (11)	59,72 (93)	71,54 (88)	51,36
C- (444)	3,61 (3)	3,3 (3)	18,44 (33)	26,37 (24)	12,93
C+ (453)	49,43 (43)	50 (46)	88,95 (161)	88,17 (82)	69,14
H (418)	69,23 (54)	73,81 (62)	97,09 (167)	91,67 (77)	82,95
♀s (média dos grupos)	38,54	42,36	66,05	69,44	54,09

Em resumo, a análise conjunta de todos os grupos experimentais (C-, C+, PG e H) mostrou que a idade das fêmeas influenciou na performance alimentar dos insetos, pois com o aumento da idade pós emergência, maior foi a proporção das fêmeas que se alimentaram e menor foi o tamanho do repasto. Este perfil geral também foi observado dentro dos grupos experimentais, em todos eles a proporção de fêmeas de 3 dias, que se alimentaram, foi menor

do que as fêmeas de 6 dias pós emergência. Entretanto, quando se comparou o tamanho do repasto sanguíneo estimado tanto por análise de imagem, quanto por dosagem de hemoglobina, os resultados foram semelhantes, sendo a proporção de insetos alimentados diferente entre os 4 grupos.

6. DISCUSSÃO

Durante a realização de diversas pesquisas sobre a fisiologia dos flebotomíneos ou sobre a interação vetor-*Leishmania* é necessário, muitas vezes, que seja quantificado o volume do repasto sanguíneo realizado por esses insetos. Embora a metodologia de dosagem de hemoglobina seja a mais difundida, existem problemas operacionais inerentes a maioria dos ensaios colorimétricos, como erros de pipetagem e a dificuldade de processar muitos insetos, que podem interferir na reprodutibilidade dos resultados (gerando falsos negativos e falso positivos), sobretudo quando se deseja separar insetos que se alimentaram muito pouco daqueles que não se alimentaram, como no caso do presente estudo. Outra limitação é a necessidade de sacrificar os insetos, fazendo com que seja necessário montar um grupo experimental “branco” para inferir o tamanho do repasto nos estudos que avaliam parâmetros desencadeados pela alimentação sanguínea dos insetos. Neste estudo, de forma pioneira, através do uso da metodologia de análise de imagem e da membrana Parafilm® M tratada com plasma gel, foi possível quantificar o tamanho do repasto sanguíneo das fêmeas por imagem e desenvolver uma alternativa de alimentação sanguínea para as mesmas, a fim de substituir completamente o uso de cobaias da metodologia de manutenção de colônias em laboratório.

O método de quantificação do tamanho do repasto sanguíneo por imagem utilizado permite que o pesquisador tenha sempre acesso aos dados utilizados, o que possibilita a revisão das fotos durante toda a análise dos resultados. Na dosagem de hemoglobina o inseto é perdido, não permitindo que o resultado, ou os dados sejam revisados/reavaliados. Além disso, o método de dosagem de hemoglobina utiliza um composto altamente tóxico, danoso para o meio ambiente e fotossensível, o cianeto de potássio (Ranzani-Paiva et al. 2013, Magno et al. 2017, Mohapatra et al. 2018). A manipulação e intoxicação por esse composto é letal para o manipulador e sua eliminação é iminente um risco biológico. Outro problema encontrado na dosagem de hemoglobina são os “falsos negativos” criados pelo viés metodológico constituído por fêmeas que se alimentaram de plasma ou plasma misturado ao sangue. Esses falsos negativos aparecem quando o resultado da quantificação de hemoglobina aponta essas fêmeas, que apresentaram variação do conteúdo abdominal, como não alimentadas. Uma vantagem da análise de imagem foi a eliminação desse viés metodológico, que também pôde ser observado na análise de imagem. Esse viés foi praticamente eliminado da análise de imagem da utilização do valor de corte calculado (média + 2 desvios padrão) a partir dos resultados obtidos com o grupo de insetos que não foram colocados em contato com a fonte de sangue aquecida (brancos).

Neste estudo, avaliamos o uso do Parafilm® M tratado com plasma gel para ser utilizado como membrana de alimentação artificial, visando minimizar o uso de cobaias na metodologia de manutenção de colônias em laboratório de *L. longipalpis*. A manutenção de colônias de laboratório para a realização destas pesquisas é de extrema importância, tendo como uma necessidade fundamental o fornecimento de uma alimentação sanguínea adequada para as fêmeas, fator crítico para a produtividade da colônia.

Foram feitos vários ensaios preliminares a fim de decidir qual seria o melhor protocolo metodológico para a alimentação *in vitro* dos insetos. Um deste ensaios foi feito com o intuito de determinar qual seria o tempo de duração ideal para alimentação em aparelho Hemotek. Inicialmente os insetos foram alimentados em aparelho Hemotek por 60 minutos. Foi observado que esse tempo de duração não era suficiente para que um número significativo de fêmeas de *L. longipalpis* realizassem o repasto sanguíneo. Por isso, o tempo de alimentação foi aumentado para 90 minutos, já que esse período foi suficiente para que as fêmeas reconhecessem a fonte de sangue e se alimentassem. Um levantamento bibliográfico realizado por Francisco et al. (2019), apontou que vários fatores podem influenciar no repasto sanguíneo de culicídeos de importância médica. Características genéticas, odor liberado pelo hospedeiro e feromônio produzido pelas fêmeas com intuito de atrair outras fêmeas para a fonte de alimentação (fator de agregação), são considerados incentivos para que os culicídeos prefiram um hospedeiro em relação a outro. A atração das fêmeas a partir da liberação de feromônio foi verificada para flebotomíneos por Schlein et al. (1984). Os autores caracterizaram o efeito convite para *P. papatasi* por meio de um feromônio liberado dos palpos das fêmeas. Esse efeito também foi descrito para *L. longipalpis*, ceratopogonídeos, simuliídeos e carrapatos do gênero *Ambylomma* (Norval et al. 1989, Blackwell et al. 1994, McCall e Lemoh 1997, Tripet et al. 2009).

Denlinger et al. (2016) verificaram em estudo realizado sobre alimentação artificial em aparelho Hemotek que as maiores porcentagens de fêmeas alimentadas foram observadas nos grupos experimentais com 500 fêmeas, quando comparados com os grupos experimentais compostos por 250 fêmeas. Este efeito pode ser explicado por um comportamento de agregação, que pode ser desencadeado em hospedeiro vivo ou *in vitro*. Os autores observaram que a agregação de fêmeas sempre se iniciava quando uma única fêmea sondava as membranas utilizadas no estudo, no caso Parafilm com “suor/odor” da pele humana e membrana de intestino de porco, até encontrar um lugar adequado para o repasto sanguíneo. Esse comportamento de agregação também foi observado para o modelo *in vivo* (camundongo *hairless*) utilizado no estudo.

Vem sendo sugerido que estes fatores de agregação durante o repasto sanguíneo de *L. longipalpis* ocorrem para beneficiar individualmente cada fêmea, pois ao sondarem “juntas” uma mesma região da pele do hospedeiro “maximizam” os efeitos da saliva, diminuindo assim o tempo necessário para uma alimentação completa, resultando em um maior aproveitamento alimentar das mesmas (Tripet et al. 2009). Outro detalhe que auxilia no fator de agregação das fêmeas na fonte de alimentação sanguínea é a presença de insetos machos. Durante ensaios preliminares foi observado que nos potes dos grupos experimentais onde havia a presença de machos (10% do número total de fêmeas – 6 machos), uma maior quantidade de fêmeas se alimentava. Os machos são excepcionais atrativos para as fêmeas, eles as atraem para os locais de alimentação pela da liberação de feromônios (Ward et al. 1988). Morton et al. (1989) demonstraram que os primeiros machos a colonizarem um local de alimentação aumentam a taxa, tanto de fêmeas quanto de machos, naquele local. Os pesquisadores dissecaram segmentos abdominais de 6 machos virgens contendo glândulas de feromônio. Um *hamster* anestesiado contendo papel filtro impregnado com o feromônio foi posicionado sobre uma plataforma dentro das gaiolas contendo as fêmeas de flebotomíneo. Durante um período de observação de 30 minutos o número de fêmeas de *L. longipalpis* aumentou de 20-50% no *hamster* que continha o disco impregnado com feromônio quando comparado com o *hamster* com o disco controle. Os resultados também demonstraram que o feromônio liberado pelos machos de *L. longipalpis* pode atrair fêmeas em distâncias de até 2,2 metros. Aparentemente as fêmeas são atraídas para reprodução e alimentação através de uma mistura do feromônio dos machos com os odores liberados pelo hospedeiro. Uma vez que essas fêmeas chegam ao local de alimentação/acasalamento o feromônio age “prendendo” estas fêmeas antes e durante a cópula.

Outro método utilizado para a atração das fêmeas para a fonte de alimentação artificial utilizado no presente estudo, foi o uso de *hamsters* para a liberação de CO₂. O estudo de Denlinger et. al (2016), mencionado anteriormente, também avaliou o uso de exalações de CO₂ na atração das fêmeas de flebotomíneo para a fonte de alimentação *in vivo* e *in vitro*. As exalações foram realizadas para simular o dióxido de carbono emitido por um hospedeiro animal. A presença de exalações aumentou a porcentagem de fêmeas de *P. papatasi* que se alimentaram de sangue, principalmente das que se alimentaram em aparelho Hemotek. Muitos dípteros hematófagos são atraídos por uma combinação de compostos químicos, incluindo CO₂, vapor de água e odores liberados pelo hospedeiro (Gibson & Torr 1999). Pinto et al. (2001) observaram que armadilhas equipadas com CO₂ foram mais eficientes na captura de flebotomíneos do que armadilhas equipadas com odores dos hospedeiros. Para os experimentos

foram utilizadas como iscas um homem e mulher (para a liberação de CO₂ e odores) e um cilindro de CO₂, em duas tendas contendo as armadilhas CDC, uma tenda sem liberação de odor ou CO₂ (controle). Os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram que o papel desempenhado pelo CO₂ e pelos odores humanos na atração das fêmeas foi o mesmo para *L. whitmani* e *L. intermedia*, com cerca de 45% de atração atribuída ao CO₂.

Além de contribuírem na atração das fêmeas de flebotômíneo para a fonte de alimentação, os *hamsters* também foram utilizados no presente estudo para a alimentação *in vivo* das fêmeas de flebotômíneo. Além de serem usados na comparação da alimentação *in vivo* com a *in vitro*, eles atuaram como um meio de controle da qualidade dos insetos utilizados em todos os ensaios de alimentação. A alimentação nos grupos H sempre se iniciou 30 minutos antes da alimentação em aparelho Hemotek. Quando as fêmeas se alimentavam nos *hamsters* por possuírem todos os atrativos como temperatura, liberação de odores, partículas de água e CO₂, significava que as fêmeas daquela geração eram saudáveis e estavam aptas para a realização dos ensaios de alimentação. Quando as fêmeas se alimentavam *in vivo* e não se alimentavam *in vitro*, isso era um indicativo de que algum problema, que ia desde a preparação das membranas até problemas técnicos do aparelho Hemotek, como falha no aquecimento do sangue, havia interferido/dificultado o repasto sanguíneo.

Como qualquer metodologia, a análise de imagem também apresentou alguns problemas. Um deles se deu provavelmente como resultado de uma falha na metodologia utilizada para a eutanásia dos insetos antes das fotos, gerando uma variação de coloração da região abdominal, como pôde ser observada em algumas fêmeas de um grupo H, que apresentaram o abdômen dividido em uma região vermelha (sangue) e uma região incolor (Figura 21F). Assim, é importante testar novos métodos para eutanásia das fêmeas, que não afetem o conteúdo abdominal e que não interfiram na fisiologia dos insetos, possibilitando sua avaliação por foto.

Um método muito utilizado durante estudos de comportamento animal e manipulação de drosófilas, é a anestesia por CO₂ (Lefranc et al. 2000). Testes preliminares realizados durante os ensaios de alimentação do presente estudo demonstraram que o CO₂ é eficiente na anestesia de *L. longipalpis*. Foi observado durante esses testes que grande parte das fêmeas “despertaram” após a anestesia, indicando que talvez não seja necessário sacrificar as fêmeas para que elas sejam fotografadas. Um estudo realizado por Bartholomew et al. (2015), verificou que a exposição ao CO₂ pode influenciar o comportamento de drosófilas. Os pesquisadores observaram reduções nos comportamentos de voo em moscas drosófilas que foram anestesiadas

com CO₂, confirmando essa hipótese. É necessário que mais testes sejam feitos para avaliar se o CO₂ também pode afetar o comportamento de flebotomíneos e se eles estão aptos a retornar para a colônia após esse procedimento.

Um outro problema observado na metodologia de análise de imagem foi uma falha na concentração de hemoglobina. Problemas com a iluminação dos insetos para as fotos impediram que as imagens refletissem a cor exata do sangue estocado no intestino das fêmeas, e conseqüentemente, estimar a concentração de hemoglobina. Inicialmente foi utilizado um transluminador que ficou posicionado abaixo das placas de petri e acima das placas de petri foi posicionado uma luz de flash que fez a iluminação superior dos insetos. Esse flash criou um reflexo no abdômen das fêmeas alimentadas encobrindo a cor do sangue, e em alguns casos, esse reflexo atrapalhou/impossibilitou a construção de M-AB e MS e a estimativa da concentração de hemoglobina. Portanto, é necessário avaliar este método com as imagens captadas apenas com o transluminador.

A cada dia que passa mais pesquisadores tem se esforçado na busca por metodologias de imagem para a quantificação da hemoglobina, a fim de reduzir custos e facilitar um processo que é tão laborioso. A medição da hemoglobina por imagem é possibilitada pela sua estrutura bioquímica. Ela é um forte cromóforo encontrado em tecidos de mamíferos, permitindo sua avaliação por meios espectroscópicos. Esta propriedade levou à pesquisa de dispositivos capazes de medir a hemoglobina usando espectroscopia transcutânea (Chaudhary et al. 2017), retiniana (McMurdy et al. 2009), mucosa (Saldivar-Espinoza et al. 2019) ou fotografia. O leito ungueal, as pregas palmares e a conjuntiva são locais do corpo humano desprovidos de melanócitos. A medição da hemoglobina nesses locais, a partir do uso de iluminação, poderiam ser mais precisos devido à ausência dos melanócitos “confundíveis” (Suner et al. 2021).

Um estudo foi realizado por Suner et al. (2021), com o intuito de se desenvolver um método não invasivo capaz de quantificar a concentração de hemoglobina através de imagens digitais obtidas por meio de aparelho *smartphone* da conjuntiva de pacientes que estiveram no pronto socorro do Hospital de Rhode Island. As fotos foram obtidas a partir do aplicativo Halide em Iphone 7 plus. Todos os dados foram transferidos para o MATLAB (Mathworks Inc, Natick, MA) para análise. Uma região de interesse (ROI) representando a área de melhor cor da conjuntiva foi selecionada (SP), sendo extraídos do ROI 26 parâmetros de análise da imagem. Os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram que o processamento de imagens RAW aliado a alta resolução e codificação de cores teve o melhor desempenho na identificação

de pacientes gravemente anêmicos e que necessitavam de transfusão. Estudos como esse reforçam a necessidade da busca por metodologias de quantificação de hemoglobina simplificadas e que sejam capazes de substituir a dosagem de hemoglobina por cianeto de potássio.

No presente estudo foram realizados ensaios com insetos de diferentes idades pós emergência dos insetos adultos, afim de avaliar se esse período interfere na preferência alimentar desses insetos. Além de avaliar qual o melhor período pós emergência para a alimentação sanguínea das fêmeas de flebotômico, os ensaios realizados com insetos provenientes de diferentes idades pós emergência/gerações, tiveram o intuito de refutar qualquer problema fisiológico que pudesse interferir/atrapalhar o repasto sanguíneo das fêmeas. Outro ponto do estudo, foi realizar os testes em dias independentes, a fim de também refutar variações de temperatura e humidade que pudessem interferir no repasto sanguíneo.

É nítido que o número de fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo, em todos os grupos experimentais (C-, C+, PG e H), aumentou em conjunto com o aumento da idade pós emergência, sendo 3 dias pós emergência a idade com menor número de fêmeas alimentadas e 6 dias a com maior número de fêmeas alimentadas. Esse aumento ocorreu principalmente no grupo PG, que teve a maior porcentagem de fêmeas alimentadas nos dias 5 e 6 pós emergência. Foi inclusive possível observar esse aumento, mesmo que pouco significativo quando comparado aos outros grupos experimentais, na quantidade de fêmeas que se alimentaram nos grupos C-. Chagas et al. (2007), verificaram que o período pós emergência dos insetos adultos ideal para alimentação é definido com base no período pós emergência em que o maior número de fêmeas realiza seu primeiro repasto sanguíneo. No estudo realizado pelos autores, 120 fêmeas de *Lutzomyia cruzi* foram alimentadas em duas fontes alimentares diferentes (ser humano e *hamster*), sendo 2 dias pós emergência a idade ideal para alimentação em ser humano e 3 dias pós emergência para alimentação em *hamsters*.

Outros estudos na mesma linha de pesquisa constataram que a idade ideal para alimentação pós emergência foi de 4 dias para *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia evandroi*, e 5 dias para *Lutzomyia lenti* (Queiróz 1995). Em todos os experimentos realizados, nos dois estudos mencionados anteriormente foi oferecido aos insetos chances iguais de alimentação em todas as fontes. A variação da escolha da fonte de alimentação de acordo com o período pós emergência aponta um forte indício de que essa escolha é regulada por algum mecanismo, ao

invés de estar relacionada somente a disponibilidade de hospedeiro (Queiróz 1995, Nieves & Pimenta 2002).

A distensão do abdômen das fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo é muito importante para induzir a digestão e o desenvolvimento ovariano. Fêmeas hematófagas de diferentes espécies de mosquitos, flebotomíneos, tabanídeos e triatomíneos colocarão um lote de ovos a cada vez que realizarem uma refeição. Este processo é chamado de concordância gonotrófica (Swellengrebel 1929). O número de ovos produzidos por essas fêmeas sempre será proporcional a quantidade de sangue ingerida, não ultrapassando a quantidade máxima pré-definida pelo número de ovariolos (Roy 1936, Goodchild 1955). A parede abdominal dos insetos hematófagos pode ser muito elástica ou possuir dobras que permitem distensão abdominal considerável durante a alimentação. Para que ocorra produção ótima de ovos, é necessário que haja a distensão completa do abdômen (Spielman & Wong 1974). Essa distensão abdominal em conjunto com a ingestão de sangue é responsável por desencadear o processo da vitelogênese.

A vitelogênese é o processo que induz a cascata de sinalização hormonal e proteica, promovendo a síntese de proteínas precursoras do vitelo, e incorporando essas moléculas aos ovócitos em desenvolvimento. O corpo gorduroso, é o maior órgão do metabolismo intermediário dos insetos, ele é responsável por transformar o alimento ingerido em estruturas celulares (Chapman 1998, Slocinska et al. 2015), além de atuar como centro do metabolismo em geral (Bretas 2016). Em *A. aegypti*, por exemplo, a ativação da produção e liberação das proteínas secretadas pelo corpo gorduroso depende diretamente da quantidade de sangue ingerido, do nível de distensão abdominal, tempo de duração da digestão e disponibilidade nutricional. A fase de síntese que marca o início do período vitelogênico ocorre durante as primeiras 30 horas após o repasto perdurando até o fim do processo digestivo (Klowden 1997, Raikhel 2002, Chen et al. 2004, Attardo et al. 2005).

Ao analisar o formato do abdômen antes e após o repasto sanguíneo, ficou constatado que o abdômen das fêmeas de *L. longipalpis* tem um formato semelhante ao de um elipsoide. A representação ilustrativa é muito parecida com a de uma bola de futebol americano, onde nenhum comprimento dos seus semieixos é igual. Porém, quando acontece de dois dos seus semieixos serem iguais, como foi observado no abdômen das fêmeas (largura e altura), o elipsoide é chamado de elipsoide de revolução. Ao se rotacionar um elipsoide de revolução em torno do seu semieixo maior obtém-se como resultado um elipsoide prolato, ou esferoide

prolato, que se assemelha a um charuto (Pecinatto 2012). Quando substituímos a área do abdômen (mm^2), pelo volume do elipsóide (mm^3) e o correlacionamos com o volume de sangue estimado (mm^3) por dosagem de hemoglobina, é obtida uma correlação igual a 0,87 (Figura 22C). Ao se comparar o volume de sangue estimado por análise de imagem com o volume de sangue estimado por dosagem de hemoglobina, o volume de sangue da dosagem é maior. Isso acontece, pois durante o repasto sanguíneo a fêmea de flebotômíneo concentra o sangue. À medida que se alimenta a fêmea defeca, jogando a parte líquida do sangue (plasma) fora e ficando apenas com a parte proteica (hemácias).

Como cerca de 80% do repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas é composto por água, o volume de sangue obtido por dosagem de hemoglobina sempre será maior do que o volume obtido por análise de imagem. Grande parte dessa água não é necessária para o desenvolvimento dos insetos, que possuem sistemas fisiológicos adaptados para uma rápida excreção para redução do peso e reestabelecimento da mobilidade do inseto. O transporte da água ocorre em uma região onde o epitélio intestinal é adaptado para a rápida eliminação da água. Em moscas tsé-tsé e triatomíneos, essa excreção ocorre através de uma bomba de $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ localizadas nas membranas basais do epitélio do intestino médio. Essa bomba muito eficiente resulta em um gradiente osmótico através do epitélio intestinal que arrasta a água passivamente (Farmer et al. 1981, Peacock 1981, Peacock 1982, Gooding 1975, Macvicker et al. 1994). Esse sistema é tão eficiente, que a mosca tsé-tsé perde cerca de 40% do peso adquirido após o repasto sanguíneo (Moloo e Kutuza 1970, Gee 1975). A precipitação das proteínas plasmáticas também auxilia na excreção rápida da água reduzindo a pressão osmótica do conteúdo intestinal (Gooding 1971).

Como o aparelho de alimentação artificial Hemotek (Hemotek Ltd.) não possui um mecanismo de circulação sanguínea, ocorreu hemossedimentação (separação dos glóbulos vermelhos e plasma) durante alguns ensaios de alimentação. Após ser identificado que algumas fêmeas ingeriram apenas um líquido de coloração clara (plasma) (Figura 21D e E), a unidade de alimentação passou a ser delicadamente agitada, para homogeneização do sangue. A velocidade de hemossedimentação sanguínea (VHS) é a medida em mm da distância em que os eritrócitos sedimentam em uma suspensão vertical de anticoagulante durante um período de tempo. A taxa de sedimentação é influenciada pela morfologia e concentração eritrocitária, composição das proteínas plasmáticas e viscosidade do plasma. Características do indivíduo

doador como sexo, idade e condição de saúde também influenciam na taxa de sedimentação (Dacie 2006, Johnstone & Reina 2017).

Não foi possível, durante a confecção da MS pelo método de análise de imagem, detectar a presença de sangue na região abdominal das fêmeas que ingeriram plasma. No caso das fêmeas que se alimentaram de sangue misturado ao plasma, a MS ficou muito pequena cobrindo apenas a parte com sangue, não sendo condizente com a real distensão abdominal das fêmeas. Na dosagem de hemoglobina não foi identificada a presença da hemoglobina nas fêmeas que ingeriram apenas plasma, ou no caso das que se alimentaram de plasma misturado ao sangue, o volume final foi muito pequeno. Ao final da análise de ambos os métodos de quantificação utilizados, esses insetos não apareciam como alimentados, ou apareciam como insetos que haviam ingerido pouca quantidade de sangue, constituindo uma fonte de viés metodológico para ambas metodologias. Mesmo que essas fêmeas não tenham se alimentado do sangue completo, não significa que elas tenham realizado um repasto sanguíneo pouco nutritivo. Diferentes estudos apontam que fêmeas podem se alimentar completamente de fontes alternativas (somente o plasma sanguíneo, sêrum, eritrócitos lavados, leite desnatado fresco, albumina diluída, etc.). No entanto, somente o plasma sanguíneo e as células do sangue, quando ingeridos separadamente, são capazes de suportar e promover a produção de ovos, geralmente em menor quantidade do que o sangue completo (Woke 1937, Greenberg 1951, Spielman & Wong 1974, Harrington et al. 2001, Harrison et al. 2021). Como o plasma de mamíferos é composto por proteínas, aminoácidos livres (isoleucina) e essenciais, ele pode fornecer nutrientes necessários para a produção de ovos (Spielman & Wong 1974, Harrison et al. 2021). Mais estudos sobre a taxa de fecundidade e viabilidade dos ovos de fêmeas alimentadas com plasma sanguíneo são necessários para comprovar se apenas o plasma é suficiente ou não para a nutrição e maturação dos ovários.

A variação de tamanho corporal das fêmeas observada a partir dos resultados obtidos tanto na análise de imagem, quanto na dosagem dos brancos, pode ter ocorrido devido a diferentes densidades larvais nos potes de oviposição. Quando o pote apresentava baixa densidade larval, resultando em menor competição por alimento e espaço físico as larvas se alimentavam bem, contribuindo para um melhor desenvolvimento das demais fases de vida do inseto e produzindo adultos maiores. Entretanto, quando a densidade larval era maior, houve competição por alimento e espaço, diminuindo a disponibilidade e a ingestão de alimento por larva resultando em insetos adultos menores. Embora o tamanho corporal de várias espécies tenha base genética,

fatores ambientais como a densidade larval, afetam diretamente seu desenvolvimento corporal e indiretamente sua fisiologia (Nelson 1986).

Em um estudo realizado por Beserra et al. (2009), foi verificado que o aumento da densidade larval em uma colônia de laboratório de *Aedes aegypti* foi prejudicial ao desenvolvimento das demais fases de vida do inseto, devido a interferência da densidade na disponibilidade de alimento. A duração da fase larval aumentou de 8,3 dias na densidade de 200 larvas/L, para 37,9 dias na de 1250 larvas/L quando foi ofertado 100mg de ração/bandeja. Isso ocorre, pois a fase larval, é a única fase em que o inseto busca alimento para o seu crescimento e desenvolvimento. Quando há escassez de alimento, o aumento da densidade ocasiona aumento da competição, o que interfere na obtenção e consequente assimilação de nutrientes. Quando a quantidade de alimento oferecido foi proporcional à quantidade de larvas/bandeja, não foram observados efeitos negativos no desenvolvimento dos insetos e a duração do desenvolvimento larval permaneceu praticamente constante, caindo de 8,3 dias para 6,0 dias. Os autores demonstraram que os adultos de maior tamanho corporal emergiram de criações com baixa densidade larval, e em todos os tratamentos, as fêmeas foram sempre maiores que os machos (Beserra et al. 2009).

De acordo com Consolli & Oliveira (1994) o melhor aproveitamento nutricional das fêmeas de *A. aegypti*, pode estar ligado ao fato de que os machos atingem o estágio de pupa mais rápido, assim como foi dito anteriormente para as espécies de flebotomíneos, disponibilizando maior proporção de alimento para as fêmeas e resultando em maior aquisição de nutrientes e, consequentemente, contribuindo para um tamanho corporal maior. Segundo Zhou et al. (2004), o suprimento alimentar larval é primariamente importante para as reservas alimentares das larvas, que irão refletir no tamanho do adulto, validando afirmações de Panizzi & Parra (1990) de que variações na quantidade ou qualidade da dieta têm efeitos profundos no desenvolvimento dos insetos. Em se tratando de colônias de laboratório o maior tamanho das fêmeas contribui para aumento da fecundidade e otimização das criações (Bezerra et al. 2009). A variação do tamanho de adultos é de importância epidemiológica já que está relacionada a fatores como longevidade, fecundidade e capacidade de dispersão por vôo (Dye 1984).

A alimentação *in vitro*, utilizando a membrana Parafilm[®] M tratada com Plasma Gel, alcançou boas porcentagens de fêmeas alimentadas com 5 (59,72%) e 6 (71,54%) dias pós emergência dos insetos adultos. O que aponta a eficiência do plasma gel na atração das fêmeas de flebotomíneo para a fonte de sangue aquecida. Denlinger et al. (2016), demonstraram que

fêmeas de *P. papatasi* se alimentam através de uma membrana Parafilm utilizando o sistema de alimentação Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, Reino Unido). Foram usadas duas membranas para alimentação *in vitro*: intestino de porco lavado com água destilada e Parafilm. O Parafilm foi enrolado no braço de um voluntário durante 10 minutos para absorver o suor e odores, com o intuito de atrair as fêmeas para a fonte de sangue aquecida. Dois sistemas de alimentação artificial *in vitro*, e um *in vivo*, foram usados durante o experimento: o Hemotek PS5 (Discovery Workshops, Accrington, Reino Unido), um alimentador de vidro (Kontes Custom Glass, Vineland, NJ), e um camundongo *hairless* anestesiado. Foram feitas 4 repetições de cada combinação de tratamento: sistema de alimentação (Hemotek e alimentador de vidro), com membrana (Parafilm e intestino de porco), 250 ou 500 fêmeas adultas de *P. papatasi*, e com ou sem exalações de CO₂.

O aumento do percentual de fêmeas alimentadas com exalação de CO₂ foi mais visível no Hemotek com Parafilm com 500 fêmeas (sem exalação= 1,3%; com exalação= 22,3%). O uso do Parafilm com suor foi uma combinação bem-sucedida para atrair fêmeas de *P. papatasi*. O resultado obtido pelos pesquisadores, assim como os resultados obtidos no presente estudo, sugerem e apoiam que uma combinação de odores (corporais/suor e Plasma gel) associados com a liberação de CO₂, funcionam como uma isca potente para flebotomíneos e que essas combinações podem ser consideradas como sistemas alternativos de alimentação, ao invés do uso de roedores, por reduzirem os custos associados a manutenção das colônias de biotério.

É importante que outros ensaios sejam realizados afim de avaliar a fecundidade e a viabilidade dos ovos das fêmeas alimentadas através dessa metodologia. Ensaios preliminares indicaram que fêmeas alimentadas em aparelho Hemotek utilizando a membrana Parafilm[®] M tratada com Plasma Gel são capazes de produzir ovos viáveis, que se desenvolveram até atingirem o estágio adulto. Também é importante definir qual o melhor período pós emergência dos adultos (5 ou 6 dias) para fecundidade e viabilidade dos ovos colocados por essas fêmeas. Sempre quando comparada a alimentação *in vivo*, a alimentação *in vitro* obterá resultados “inferiores”, pois, como dito anteriormente, os hospedeiros vivos fornecem uma diversidade de atrativos para as fêmeas (temperatura corporal, liberação de odores, CO₂ e vapor de água) que os torna mais eficientes para o repasto sanguíneo. No entanto, isso não invalida a necessidade de se buscar métodos alternativos que acabem com o sofrimento imputado as cobaias durante os processos de manutenção das colônias de laboratório e ensaios de infecção experimental.

7. CONCLUSÕES

- A idade das fêmeas pós emergência (3-6 dias) influencia nos parâmetros alimentares dos flebotomíneos. Enquanto a porcentagem de insetos que realizam o repasto sanguíneo aumenta nas fêmeas com maior tempo pós emergência dos insetos adultos (5-6 dias), o tamanho do repasto tende a ser menor, sendo maior nas fêmeas com menor tempo pós emergência (3-4 dias). Este perfil geral também foi observado dentro dos grupos experimentais.
- Em todos os grupos a proporção de fêmeas com 3 dias pós emergência dos insetos adultos alimentadas foi significativamente menor do que a proporção de fêmeas alimentadas com 6 dias pós emergência.
- O Plasma gel foi eficiente na atração das fêmeas para a fonte de alimentação contendo a membrana Parafilm®. A porcentagem média de fêmeas alimentadas no grupo PG (Parafilm tratado com plasma gel) foi ~4 vezes maior do que a do grupo C- (Parafilm sem tratamento). A proporção média de fêmeas alimentadas no grupo PG foi de 55,7%, variando de 31,9% (3 dias) a 71,5% (6 dias). Embora o grupo PG tenha ficado aquém do grupo C+ (membrana de pele de pintinho) em ~ 24%, a proporção de insetos alimentados de 71,5% apresentada com fêmeas de 6 dias, é perfeitamente compatível com o seu uso para manutenção e criação de flebotomíneos em laboratório.
- A utilização nos testes de alimentação *in vitro*, de fêmeas com 6 dias pós emergência, bem como, a permanência durante todo os experimentos de um *hamster* (fonte de CO₂) para atração das fêmeas para a fonte de alimentação artificial, certamente contribuiu para as altas porcentagens de insetos alimentados apresentadas pelos grupos PG (72%) e C+ (88%).
- De maneira geral, a performance alimentar dos flebotomíneos é maior *in vivo* do que *in vitro*, mesmo quando se utiliza a pele de pintinho (“padrão ouro”) como membrana de alimentação. Os grupos alimentados em *hamster* (H), apresentaram as maiores porcentagens médias de insetos alimentados *in vitro* independentemente da idade de emergência das fêmeas.
- Os altos índices de convergência obtidos nas comparações (qualitativa e quantitativa) entre as metodologias de dosagem de hemoglobina e análise de imagem, validaram a análise de imagem como metodologia para avaliação do repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler S, Theodore O 1927. The behaviour of cultures of *Leishmania tropica*, *L. infantum* and *L. braziliensis* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Nature*. 119: 48-49
- Aguiar GM, Vilela ML, Lima RB 1987. Ecology of the sandflies of Itaguaí, in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro. Feed preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 82: 583-584
- Alexander J, Russel DG 1978. Unusual axonemal doublet arrangements in the flagellum of *Leishmania* amastigotes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72(4): 345-347
- Alleman A 1990. The effects of hemolysis and lipemia on serum biochemical constituents. *Veterinary Medicine*. 85: 1272-1284
- Alten B, Maia C, Afonso MO, Campino L, Jimenez M, Gonzalez E, Banuls AL, Prudhomme J, Vergnes B, Toty C, Cassan C, Rahola N, Thierry M, Sereno D, Bongiorno G, Bianchi R, Khoury C, Tsigotakis N, Dokianakis E, Antoniou M, Christodoulou V, Mazeris A, Karakus M, Ozbel Y, Arserim SK, Erisoz Kasap O, Gunay F, Oguz G, Kaynas S, Tsertsvadze N, Tskhvaradze L, Giorgobiani E, Gramiccia M, Volf P, Gradoni L 2016. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 10(2) e0004458
- Anderson J, Jones B, Yang J, Shaw M, Watt C, Koshevoy P, Spaltenstein J, Jurrus E, Kannan UV, Whitaker R, Mastrorade D, Tasdizen T, Marc R 2009. A computational framework for ultrastructural mapping of neural circuitry. *PLoS Biol*. 7 e1000074
- Andrade A, Galati E 2012. A New Species of *Evandromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) From Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 49 (3): 445–450
- Attardo GM, Hansen I, Raikhel AS 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect biochemistry and molecular biology*. 35(7): 661-675
- Bao Z, Murray J, Boyle T, Ooi S, Sandel M, Waterston R 2006. Automated cell lineage tracing in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2707–2712.
- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, de Paula KM, Dias ES 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 38: 421-425
- Bartholomew NR, Burdett JM, Vaden Brooks JM, Quinlan MC, Call GB 2015. Impaired climbing and flight behaviour in *Drosophila melanogaster* following carbon dioxide anaesthesia. *Scientific Reports*. 5(15298): 1-10.
- Bern C, Maguire JH, Alvar J 2006. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2(10): e313.

- Beserra E, Fernandes C, Ribeiro P 2009. Relação entre Densidade Larval e Ciclo de Vida, Tamanho e Fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em Laboratório. *Neotropical Entomology*. 38(6):847-852
- Bittencourt A 2009. Aspectos histopatológicos e ultra estruturais da Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD). *Gazeta Médica da Bahia*.79 (3):45-51
- Brazil R, Brazil B 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. *Flebotomíneos do Brasil - Fiocruz*. 257- 274
- Brazil R, Brazil B 2018. Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. *Brazilian Sand Flies*. 299-318
- Bretas J. Corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Tese de Doutorado. Seropédica. 2016.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Parasites – Leishmaniasis: Biology. CDC. 2020.
- Chagas A, Medeiros J, Justiniano S, Pessoa F 2007. Haematophagic behavior in laboratory of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) in relation to three mammalian blood sources in Manaus, Brazil. *Acta Amazonica*. 37(1): 127-132
- Chanotis B 1975. A new method for rearing *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae), with observations on its development and behavior in the laboratory. *J. Med. Ent.* 12 (2): 183-188
- Chapman RF 1998. *The Insects: structure and function*. 4th edition. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.
- Chaudary R, Dubey A, Sonker A 2017. Techniques used for the screening of hemoglobin levels in blood donors: current insights and future directions. *Journal of Blood Medicine*. 8: 75–88
- Chaudhary R, Dubey A, Sonker A. Techniques used for the screening of hemoglobin levels in blood donors: current insights and future directions. *J Blood Med*. 2017; Volume 8: 75–88. <https://doi.org/10.2147/JBM.S103788> PMID: 28740442 10.
- Chen L, Zhu J, Sun G, Raikhel AS 2004. The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of molecular endocrinology*. 33(3): 743-761
- Christensen H 1971. Colonization of *Lutzomyia trinidadensis* and *L. vespertilionis* (Diptera: Psychodidae). *Annals of The Entomological Society of America*. 65 (3): 683-686
- Colacicco-Mayhugh M, Masuoka P, Grieco J 2010. Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Middle East. *International Journal of Health Geographics*. 1476-072X
- Collinet C, Stöter M, Bradshaw C, Samusik N, Rink J, Kenski D, Habermann B, Buchholz F, Henschel R, Mueller M, Nagel W, Fava E, Kalaidzidis Y & Zerial M 2010. Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature* 464, 243–249

- Consoli RAGB, Oliveira RL 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 225p.
- Cosgrove J, Wood R, Petric D, Evans D, Abbot R 1994. A convenient mosquito membrane feeding system. J. Am. Mosq. Control Assoc. 10: 434-436
- Costa S, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio J, Lainson R, Rangel E 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil Mini-review. 102(2): 149-153
- Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodríguez A, Alvar J 2002. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. Lancet 30(359): 1124–1125.
- Dacie JV 2006. Dacie and Lewis practical haematology. 10^a ed. Elsevier Health Sciences.
- Denlinger D, Li A, Durham S, Lawyer P, Anderson J, Bernhardt S 2016. Comparison of *In Vivo* and *In Vitro* Methods for Blood Feeding of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Laboratory. Journal of Medical Entomology. 1–5
- Diaz-Albiter H, Sant'Anna M, Genta F, Dillon R 2012. Reactive Oxygen Species-mediated Immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the Phlebotomine Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*. The journal of biological chemistry. 287 (28): 23995–24003
- Dougherty MJ, Ward RD 1991. Methods for reducing *Ascogregarina chagasi* parasitaemia in laboratory colonies of *Lutzomyia longipalpis*. Parasitologia, 33(1): 185-191
- Dye C 1984. Competition amongst larval *Aedes aegypti*: the role of interference. Ecological Entomology. 9:335-357
- Dye C, Davies C, Lainson R 1991. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil.
- Farmer J, Maddrell SHP, Spring JH 1981. Absorption of fluid by the midgut of *Rhodnius*. J. Exp. Biol. 94: 301–16
- Feliciangeli M 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology. (18): 71-80
- Fernandez R, Das P, Mirabet V, Moscardi E, Traas J, Verdeil J, Malandain G & Godin C 2010. Imaging plant growth in 4D: robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. Nat. Methods 7, 547–553.
- Forattini O 1953. Nota sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peridomiciliares, no estado de São Paulo. Arquivos Da Faculdade De Higiene E Saúde Pública Da Universidade De São Paulo. 7(2): 157-168
- Forattini O 1973. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanoses, Bartonelose. Edgard Blucher. Entomologia medica. (4): 658
- Forattini O 1973. Subfamília Phlebotominae - Biologia. Entomologia Médica. 119-206

- Fowlkes C, Hendriks CL, Keranen S, Weber G, Rubel O, Huang M, Chatoor S, DePace A, Simirenko L, Henriquez C, Beaton A, Weiszmann R, Celniker S, Hamann B, Knowles D, Biggin MD, Eisen M, Malik J 2008. A quantitative spatiotemporal atlas of gene expression in the *Drosophila blastoderm*. *Cell* 133, 364–374.
- Galati E, Nunes V, Rego F, Oshiro E, Chang M 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. (31): 378-90
- Galati EAB 2003. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF, Lainson R (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro: Fiocruz. 23-51
- Gee JC 1975. Diuresis in the tsetse fly *Glossina austeni*. *J. Exp. Biol.* 63: 381–90
- Gemetchu T 1971. Liver and yeast as larval diets in the colonization of a sandfly (*Phlebotomus longypalpis*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (impress).
- Gibson G & Torr SJ 1999. Visual and olfactory responses of hematophagous Diptera to host stimuli. *Med. Vet. Entomol.* 13: 2–23
- Goodchild AJP 1955. Some observations on growth and egg production of the blood-sucking *Reduviids*, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Proc. R. Ent. Soc.* 30: 137–44
- Gooding RH 1975. Inhibition of diuresis in the tsetse fly (*Glossina morsitans*) by ouabain or acetazolamide. *Experientia.* 31: 938–9
- Gordon R, Crewe W 1952. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of *Chrysops* and *Cimex*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 42: 335-356
- Greenberg J 1951. Some nutritional requirements of adult mosquitoes (*Aedes aegypti*) for oviposition: Two figures. *The Journal of nutrition.* 43(1): 27-35
- Handman E, Bullen DVR 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.*18: 332-334
- Hanson W 1961. The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (Diptera: Psychodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 54:317-322
- Harrington LC, Edman JD, Scott TW 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood. *Journal of medical entomology.* 38(3): 411-422
- Harrison RE, Brown MR, Strand MR 2021. Whole blood and blood components from vertebrates differentially affect egg formation in three species of anautogenous mosquitoes. *Parasites & vectors.* 14(1): 1-19
- Harwood R, James M 1979. *Entomology in Human and Animal Health*. Macmillan Publishing Colk Inc. (7): 548

- Hertig M, Johnson P 1961. The Rearing of *Phlebotomus* Sandflies (Diptera: Psychodidae) I. Technique. *Annals of The Entomological Society of America*. 54 (6): 753-76
- Johnstone CP, Lill A, Reina RD 2017. Use of erythrocyte indicators of health and condition in vertebrate ecophysiology: a review and appraisal. *Biological Reviews*. 92(1): 150-168
- Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*. 290: 1351-4
- Kassem H, Nogoumy N, Sawaf B 2012. Impacto of urbanization on the sand fly *Phlebotomus langeroni nitzulescu* in na old focus of Viseral Leishmaniasis in Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 42(3): 619 – 624
- Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J & Stelzer EH 2008. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science* 322, 1065–1069.
- Keohane EM, Otto CN, Walenga JM 2020. *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*. 6^a ed. Saint Louis: Elsevier.
- Killick-Kendrick R 1979. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. W.H.R Lumsden and D.A. Evans (eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. (2): 395-460
- Killick-Kendrick M, Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*. 17: 279-289
- Killick-Kendrick R 1978. Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies: a review. *Acta Tropica*. (35): 297-313
- Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clinics in Dermatology*. 17: 279-289
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M 1987. The laboratory colonization of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae), *Annales de Parasitologie Humaine et Comparte*. 62: 354-258
- Killick-Kendrick R, Leaney A, Ready P 1977. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Ent.* 13(4-5): 429-440
- Kirch H, Teel P, Kloft W, Deloach J 1991. Artificial feeding of *Ornithodoros concanensis* (Acari: Argasidae) nymphs on bovine blood and morphological changes in erythrocytes undergoing hemolysis in the tick midgut. *Journal of Medical Entomology*. 28(3): 450-455
- Klowden MJ 1997. Endocrine aspects of mosquito reproduction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. *Entomological Society of America*. 35(4): 491-512
- Koseoglu M, Hur A, Atay A, Çuhadar S 2011. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. *Biochimica Medica*. 21(1): 79-85
- Lainson R 1984. Presente situação da leishmaniose visceral na Amazônia, com especial referência a um novo surto da doença ocorrido em Santarém, Estado do Pará, Brasil. *Boletim de Epidemiologia*. 52: 655-681

- Lainson R 1985. Leishmaniasis in Brazil, XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 79: 223-226
- Lainson R, Ryan L & Shaw J 1987. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 82: 421-424
- Lainson R, Ward R, Shaw J 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*. 266: 628-630
- Lane R 1993. Sandflies (Phlebotominae). *Medical Insects and Arachnids*. Chapman and Hall. 78–119
- Lawyer P, Killick-Kendrick M, Rowland T, Rowton E, Volf P 2017. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). *Parasite*. 24-42
- Lawyer P, Perkins P 2000. Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Medical Entomology*. 23-298
- Lawyer PG, Young DG 1991. Diapause and quiescence in the neotropical sand fly *Lutzomyia diabolica* (Hall). *Parassitologia* 33(1): 353-360.
- Lefranc A, Bundgaard J 2000. The influence of male and female body size on copulation duration and fecundity in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*. 132(3): 243-247.
- Lewis D & Domoney C 1966. Sugar meals in Phlebotominae and Simuliidae (Diptera). *Physiological Entomology: How insects work – Linking Genotype to Phenotype*. (41): 175-179
- Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, Minter DM 1977. Proposals for a stable classification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Entomol*. 2:319-332
- Long F, Peng H, Liu X, Kim SK & Myers E 2009. A 3D digital atlas of *C. elegans* and its application to single-cell analyses. *Nat. Methods* 6, 667–672.
- Macvicker JAK, Billingsley PF, Djamgoz MBA, Harrow ID 1994. Ouabain-sensitive Na⁺/K⁺-ATPase activity in the reservoir zone of the midgut of *Stomoxys calcitrans* (Diptera, Muscidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 24:151–9
- Marshall G, Phyllis J 1961. The Rearing of *Phlebotomus* Sandflies (Diptera: Psychodidae) I Technique. *Annals of The Entomological Society of America*. 753-764
- McMurdy J, Jay G, Suner S, Crawford G. Photonics-based In Vivo total hemoglobin monitoring and clinical relevance. *J Biophotonics*. 2009; 2: 277–287. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910019> PMID: 19378288
- Megason SG & Fraser SE 2007. Imaging in systems biology. *Cell* 130, 784–795.
- Missawa N, Lorosa E, Dias E 2008. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(4):365-368

- Modi G, Tesh R 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 20:568–569
- Moloo SK, Kutuza SB 1970. Feeding and crop-emptying in *Glossina brevipalpis* Newstead. *Acta Trop.* 27: 356–77
- Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol* 30: 427-35.
- Morton IE, Ward RD 1989. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. *Medical and Veterinary Entomology.* 3(2): 19-223
- Murray J, Bao Z, Boyle T, Boeck M, Mericle B, Nicholas T, Zhao Z, Sandel M & Waterston R 2008. Automated analysis of embryonic gene expression with cellular resolution in *C. elegans*. *Nat. Methods* 5, 703–709.
- Nelson JM 1986. *Aedes aegypti*: Biología y ecología. Organización Panamericana de Salud. 86-64
- Neumann B, Walter T, Hériché J, Bulkescher J, Erfle H, Conrad C, Rogers P, Poser I, Held M, Liebel U, Cetin C, Sieckmann F, Pau G, Kabbe R, Wünsche A, Satagopam V, Schmitz M, Chapuis C, Gerlich D, Schneider R, Eils R, Huber W, Peters J, Hyman A, Durbin R, Pepperkok R & Ellenberg J 2010. Phenotypic profiling of the human genome by timelapse microscopy reveals cell division genes. *Nature.* 464: 721–727
- Nieves E, Pimenta PF 2002. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 67(6): 640-647
- Novak M, Berry W, Rowley W 1991. Comparison of four membranes for artificially bloodfeeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7: 327–329
- Nunn F, Baganz J, Bartley K, Hall S, Burgess S, Nisbet A 2020. An improved method for in vitro feeding of adult female *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) using Baudruche membrane (goldbeater's skin). *Parasites Vectors.* 13:585
- O'Neill SL, Feldman BF 1989. Hemolysis as a Factor in Clinical Chemistry and Hematology of the Dog. *Veterinary Clinical Pathology.* 18(3): 58-68
- Paiva B, Secundino N, Pimenta P, Galati E, Junior H, Malafronte R 2007. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad. Saúde Pública.* 23(1):87-94
- Panizzi AR, Parra JRP 1990. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Manole, São Paulo, 1ª ed., 359p.
- Passos-Dias FO, Lorosa EL, Rebelo JMM 2003. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública.* 19:1373-1380

- Peacock AJ 1981. Distribution of (Na⁺ K⁺)-ATPase activity in the mid-guts and hind-guts of adult *Glossina morsitans* and *Sarcophaga nodosa* and the hind-gut of *Bombyx mori* larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 69: 133–136
- Peacock AJ 1982. Effects of sodium transport inhibitors on diuresis and midgut (Na⁺ and K⁺) ATPase in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *J. Insect Physiol.* 28: 553–8
- Pecinatto H. Aplicações não-convencionais da Lei de Gauss do eletromagnetismo. Relatório final de Iniciação científica. Manaus. 2012
- Peng H, Chung P, Long F, Qu L, Jenett A, Seeds A, Myers E & Simpson J 2011. BrainAligner: 3D registration atlases of *Drosophila brains*. *Nat. Methods* 8, 493–500
- Pinto MC, Campbell-Lendrum DH, Lozovei AL, Teodoro U, Davies CR 2001. Phlebotomine sand fly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Medical and veterinary entomology.* 15: 132-139
- Quaresma P. Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores. Tese de Doutorado. Belo Horizonte. 2011
- Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho E, Riley L, Wilson M, Schriefer A 2012. Association between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strain Polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology.* 50(12): 4028-4034
- Queiróz RG 1995. Phlebotomine Sand flies of a leishmaniasis focus in Baturité, Brazil. PhD's Thesis, Department of Biology, Imperial College of Science, Technology and Medicine, University of London, Ascot, UK. 227 pp.
- Quinnell RJ, Courtenay O 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136(14): 1915–1934
- Raikhel AS, Kokoza VA, Okoza VA, Zhu J, Martin D, Wang SF, Li C, Attardo G 2002. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect biochemistry and molecular biology.* 32(10): 1275-1286
- Ready P 1978. The feeding habits of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 14 (5): 445-452
- Rodhain J, Pons C, Vandebanden J, Bequaert J 1912. Contribution au mecanisme de la transmission des trypanosomes par les glussinen. *Archiv für Schiffis-und Tropen-Hygiene.* 16: 732-739
- Roy DN 1936. On the role of blood in ovulation in *Aedes aegypti* (Linn). *Bull. Ent. Res.* 27: 423–9
- Saalfeld S, Cardona A, Hartenstein V & Tomancak P 2010. As-rigid-aspossible mosaicking and serial section registration of large sistem datasets. *Bioinformatics* 26, 157–163.
- Safyanova V 1964. Laboratory cultivation of sandflies (Diptera: Phlebotominae). *Bulletin of the World Health Organization.* 31: 573-576

- Saldivar-Espinoza B, Nuñez-Fernández D, Porrás-Barrientos F, Alva-Mantari A, Leslie LS, Zimic M. Portable System for the Prediction of Anemia Based on the Ocular Conjunctiva Using Artificial Intelligence. 33rd Conference on Neural Information Processing Systems (NeurIPS 2019). Vancouver, Canada; 2019
- Schlein Y 1993. *Leishmania* and sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today*. 9: 255-258.
- Schlein Y, Jacobson RL, Messer G 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci*. 89: 9944
- Schlein Y, Jacobson RL, Shlomai J 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc R Soc London B*. 245: 121-126.
- Schlein Y, Yuval B, Warburg A 1984. Aggregation pheromone released from the palps of feeding female *Phlebotomus papatasi* (Psychodidae). *J. Insect Physiol*. 30: 153–156
- Schmidt M 1964. Laboratory Culture of two *Phlebotomus* Species, *P. papatasi* and *P. orientalis*. *Wld Hlth Org*. 31: 577-578
- Shariff A, Kangas J, Coelho LP, Quinn S & Murphy RF 2010. Automated image analysis for high-content screening and analysis. *J. Biomol. Screen*. 15, 726–734.
- Sherlock I, Sherlock V 1971. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. *Rev. Brasil. Biol*. 32: 209-217
- Shimabukuro PHF, Galati EAB 2011. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropica*, São Paulo, v. 11, n. 1.
- Singh RK, Pandey HP, Sundar S 2006. Visceral leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. *Indian J Med Res*. 123: 331-344
- Slocinska M, Czubak T, Marciniak P, Jarmuszkiewicz W, Rosinski G 2015. The activity of the monosulfated sulfakinin Zopat-sk-1 ligated larvae of the beetle *Zophobas atratus*. *Peptides*. 69: 127-32
- Snyder JA, Rogers MW, King MS, Phillips JC, Chapman JF, Hammett-Stabler CA 2004. The impact of hemolysis on Ortho-Clinical Diagnostic's ECi and Roche's elecsys immunoassay systems. *Clinica Chimica Acta*. 384: 181-187
- Sousa-Paula L, Otranto D, Dantas-Torres F 2020. *Lutzomyia longipalpis* (Sand Fly). *Trends in Parasitology*. (36): 796-797
- Spielman A, Wong J 1974. Dietary factors stimulating oogenesis in *Aedes aegypti*. *The Biological Bulletin*. 147(2): 433-442
- Suner S, Rayner J, Ozturan IU, Hogan G, Meehan CP, Chambers AB, Baird J, Jay G 2021. Prediction of anemia and estimation of hemoglobin concentration using a smartphone camera. *PLoS ONE* 16(7): e0253495.

- Swellengrebel NH 1929. La dissociation des fonctions sexuelles de nutritives (dissociation gonotrophique) d'*Anopheles maculipennis* comme cause du paludisme dans les Pays-Bas et ses rapports avec 'l'infection domiciliaire'. Ann. Inst. Pasteur. 43: 1370–89.
- Telen MJ, Kaufman RJ 2004. The mature erythrocyte. In: GREER, J.P. Wintrobe's clinical hematology. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins. 217-247
- Teles C, Basano S, Zagonel-Oliveira M, Campos J, Oliveira A, Freitas R, Medeiros J, Pessoa F, Barral A, Camargo L 2013. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 46(1):60-66
- Tesh RB, Guzman H 1998. Sand flies and the agents they transmit. In: Beaty BH, Marquardt WC, editors. The Biology of Disease Vectors. Niwot CO: University of Colorado Press. 117-27
- Triplet FS, Clegg DE, Ward RD 2009. Cooperative bloodfeeding and the function and implications of feeding aggregations in the sand fly, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). PLoS Negl. Trop. Dis. 3: e503.
- Vannier-Santos MA, Martiny A, Souza W 2002. Cell Biology of *Leishmania spp.*: Invading and Evading. Current Pharmaceutical Design. 8: 297-318
- Volf P, Volfova P 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. Journal of Vector Ecology. 36: 1-9.
- Warburg A, Ostrovska K, Lawyer PC 1991. Pathogens of phlebotomine sandflies: a review, pp. 510-526, in Maroli M, editor. Proc. 1° Int. Symposium on Phlebotomine Sandflies, Rome. Parassitologia, 13 (suppl. 1), 519-526.
- Ward R 1977. The colonization of *Lutzomyia flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae), a vector of *Leishmania mexicana amazonenses* in Brazil. J. Med. Ent. 14 (4): 469-447
- Ward RD 1974. Studies on the adult and immature stages of some phlebotomine sandflies (Diptera; Phlebotomidae) in Northern Brazil. Ph.D thesis, University of London, 321 pp.
- Ward RD, Morton IE, Lancaster V, Smith PA, Swift. 1988. Bioassays as an indicator of pheromone communication in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). NATO ASI Series. 171: 235–243
- Wenyon CM 1926. Protozoology: A manual for medical men, veterinarians and zoologists. London: Bailliere, Tindall & Cox. (2) 1563
- WHO -World Health Organization. Leishmaniasis: background information. WHO. 2021;
- Woke PA 1937. Comparative effects of the blood of different species of vertebrates on egg-production of *Aedes aegypti* Linn. American Journal of Tropical Medicine. 17(5): 729–745
- Wu A. Caracterização biológica e molecular de cepas de *Leishmania (Leishmania) major*-like isoladas no Brasil e análise da expressão diferencial de genes possivelmente envolvidos com infecciosidade. Tese de Doutorado. Belo Horizonte. 2007

- Young D 1979. A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). University of Florida Agricultural Experiment Station Bulletin. 266
- Young DG & Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Associated Publishers, American Entomological Institute. 881 p.
- Young DG, Lewis DJ 1977. Pathogens of Psychodidae (phlebotomine sand flies), in Bibliography on Pathogens of Medically Important Arthropods, Roberts DW, Castillo JAI, Editors. Bulletin of the World Health Organization. 55: 9-24
- Young P, Perkins V, Endris R 1981. A Larval diet for rearing Phlebotomine sand flies (Diptera; Psychodidae). J. Med. Ent. 18 (5): 446
- Yücel D, Dalva K 1992. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical testes. Clinical Chemistry. 38(4): 575-577
- Zeledon R, Murrillo J, Gutierrez H 1984. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 79: 455-459
- Zhou G, Pennigton E, Wells MA 2004. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. Ins Biochem Mol Biol. 34: 919-925

9. ANEXOS

9.1 Glossário dos termos utilizados na análise de imagem e recursos do programa Fiji

ImageJ

Area: área da imagem ou da seleção (M-AB e MS) em pixels.

Straight selections: ferramentas para criar seleções de linha.

Mesure: com base no tipo de seleção (M-AB e MS), calcula e exibe na “Tabela de resultados” estatísticas de área, comprimentos e ângulos de linha ou coordenadas de ponto. As medições realizadas podem ser especificadas na caixa de diálogo *Set measurements*

Set Scale: define a escala espacial da imagem ativa para que os resultados da medição possam ser apresentados em unidades como mm ou μm .

Polygon selections: cria seleções de formato irregular definidas por uma série de segmentos de linha. O comprimento e o ângulo do segmento são exibidos na barra de status durante o desenho.

Split channels: divide uma imagem RGB em três imagens em tons de cinza de 8 bits contendo os componentes vermelho, verde e azul do original. Os nomes das janelas têm um anexo (red), (gren) e (blue).

Make binary: converte uma imagem em preto e branco.

Histogram: calcula e exibe um histograma da distribuição de valores de cinza na imagem ou seleção ativa. O eixo X representa os possíveis valores de cinza e o eixo Y mostra o número de pixels encontrados para cada valor de cinza. A Contagem total de pixels também é calculada e exibida, assim como o valor de cinza *Mean*, desvio padrão (*StdDev*), mínimo (*Min*), máximo (*Max*) e modal (*Mode*). Ele fornece para cada nível de cinza o número de pixels correspondentes na imagem. Através do histograma pode-se obter informações como a qualidade quanto ao nível de contraste e quanto ao brilho médio (se a imagem era predominantemente clara ou escura).

Wand tool: cria uma seleção (M-AB e MS) traçando objetos de cor uniforme ou objetos com limites.

Roi manager: ferramenta para trabalhar com múltiplas seleções (M-AB e MS). As seleções podem ser de diferentes locais em uma imagem, de diferentes partes de um objeto/local ou de diferentes imagens. Todos os tipos de seleção, incluindo pontos, linhas e texto, são suportados.

CIELAB: O espaço de cores CIELAB, também conhecido como $L^*a^*b^*$, é um espaço de cores definido pela Comissão Internacional de Iluminação (abreviado CIE) em 1976. Esse sistema expressa a cor como três valores: L^* para luminosidade perceptiva e a^* e b^* para as quatro cores únicas da visão humana: vermelho, verde, azul e amarelo. O CIELAB foi concebido como um espaço perceptivelmente uniforme, onde uma determinada mudança numérica corresponde a uma mudança de cor percebida semelhante. Embora o espaço LAB não seja realmente uniforme em termos de percepção, é útil na indústria para detectar pequenas diferenças de cor. O espaço de cores CIELAB é um modelo de "observador padrão" independente de dispositivo. As cores que ele define não são relativas a nenhum dispositivo específico, como um monitor de computador ou uma impressora, mas estão relacionadas ao observador padrão CIE, que é uma média dos resultados de experimentos de correspondência de cores em condições de laboratório.

Threshold: define automaticamente ou interativamente valores de limite inferior e superior, segmentando imagens em tons de cinza em recursos de interesse e plano de fundo.

Mean gray value: soma dos valores de cinza de todos os pixels da imagem ou da seleção (M-AB e MS), dividido pelo número total de pixels.

Mean: o valor da média dos pixels da imagem ou seleção (M-AB e MS).

Perimeter: comprimento contínuo da borda de uma imagem ou segmento.

Min & Max gray level: valores mínimo e máximo de cinza na imagem ou seleção (M-AB e MS).

Integrated densiti (IntDen): é o equivalente ao produto da área com o valor médio de cinza.

RawIntDen: a densidade integrada bruta é a soma dos valores de pixel.

Median: o valor da mediana dos pixels da imagem ou da seleção (M-AB e MS).

Fit Ellipse: ajusta uma elipse à seleção (M-AB). Usa os títulos *Major*, *Minor* e *Angle*. *Major* e *Minor* são os eixos primário e secundário da elipse de melhor ajuste.